Н. Л. ШИМАНОВСКИЙ, М. А. ЕПИНЕТОВ
М. Я. МЕЛЬНИКОВ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И НАНОФАРМАКОЛОГИЯ

Глава 1

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФАРМАКОДИНАМИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Термин «фармакодинамика» определяет подвижность (динамичность) действия лекарственных средств на разных уровнях биологической организации. Фармакодинамика включает разделы, посвящённые механизмам и локализации действия лекарственных веществ на системном, органном, тканевом, клеточном, субклеточном, молекулярном, субмолекулярном уровнях и изучению комплекса фармакологических эффектов в зависимости от особенностей организма и характера патологического процесса.

Действие лекарственных веществ (ЛВ) может быть общим (неспецифическим) или избирательным (специфическим). Об общем действии говорят, когда фармакологический агент оказывает неспецифическое влияние на большинство органов и тканей организма (например, анаболические препараты, биогенные стимуляторы). В том случае, когда препарат оказывает специфическое действие на какие-либо строго определённые структуры в органах, речь должна идти об избирательном действии. Так, сердечные гликозиды обладают избирательным действием на сердечную мышцу, аналептики — на дыхательный и сосудодвигательный центры в продолговатом мозге. Понятно, что такое деление весьма условно. Ведь когда говорят об избирательном действии, то имеют в виду основной терапевтический эффект и пренебрегают другими, менее важными эффектами. Поэтому предложено говорить о преимущественном действии ЛВ на те или иные органы и структуры [11].

Иногда бывает, что преимущественность действия определяется накоплением ЛВ в определённых органах, но это не всегда так. Например, сердечные гликозиды накапливаются в надпочечниках (более 90%), практически не оказывая на них действия, а малые их количества, сосредоточенные в миокарде, обусловливают терапевтический эффект.

Различают обратимое и необратимое действие ЛВ. Под обратимым подразумевают такое действие, когда функции клеток и тканей восстанавливаются через определённое время (местные анестетики, снотворные, спазмолитики и др.). Если же восстановления функции и структуры тканей не происходит, говорят о необратимом действии (прижигающие, противоопухолевые средства, радиоактивные изотопы и др.). Следует помнить, что необратимыми являются изменения, возникающие под действием токсических доз практически всех лекарств.

Размеры молекул ЛВ изменяются от отдельных атомов (ионы лития) до крупных макромолекул (ферменты). Однако большинство ЛВ имеет средние размеры (молекулярная масса от 100 до 1000 Да). Среди ЛВ встречаются все классы органических соединений — углеводы, белки, липиды, а также различные комбинации неорганических веществ. Большинство ЛВ представляют собой соли либо слабые кислоты или основания.

Фармакологическим эффектом называют изменение функции клеток, органов или систем организма, возникающее под влиянием ЛВ. В большинстве случаев он является результатом взаимодействия молекул ЛВ с различными рецепторами. Это взаимодействие называется первичной фармакологической реакцией. Такая реакция

является началом формирования общего ответа организма на воздействие ЛВ, который называют вторичной фармакологической реакцией. Весь процесс от первичного взаимодействия ЛВ с молекулой-мишенью (рецептором) до реализации его эффекта на целостном организменном уровне включает множество сложных биохимических этапов. Кроме того, характер воздействия ЛВ на организм определяется в первую очередь рядом факторов со стороны самого ЛВ: физическими свойствами, химической структурой, дозой (концентрацией) препарата, а также его лекарственной формой.

Вместе с тем первичная фармакологическая реакция практически на любое вещество может быть изменена в ту или иную сторону вследствие каких-либо особенностей организма и внешней среды, в условиях, в которых происходит действие данного препарата. Таким образом, правильное представление о фармакологическом действии лекарственного средства можно составить только при комплексной оценке взаимодействия его с организмом и окружающей средой. Мы считаем своевременным появление понятия «экологическая фармакология».

Фармакодинамика ЛВ в значительной степени обусловлена его химическим строением — наличием функционально активных группировок, формой и размером молекул.

Вещества, близкие по химическому строению, обладают, как правило, сходными фармакологическими свойствами. Например, различные производные барбитуровой кислоты (барбитураты) вызывают угнетение центральной нервной системы и применяются в качестве снотворных и наркозных средств. Но иногда сходные по структуре вещества обладают принципиально разными фармакологическими свойствами (например, препараты мужских и женских половых гормонов), а в ряде случаев одинаковое действие присуще веществам различного химического строения (например, морфин и промедол).

Выявление зависимости действия лекарств от их структуры имеет несомненное значение для целенаправленного синтеза новых лекарственных препаратов. Синтез многих медикаментозных средств (например, наркотических анальгетиков — промедола, фентанила) был осуществлён путём подражания (в том числе усложнения либо упрощения) химической структуры известных ранее лекарственных веществ растительного происхождения (морфина).

Специфическое действие ЛВ прежде всего зависит от характера и последовательности атомов в молекуле, наличия и положения в ней функционально активных радикалов.

Замена лишь одного атома в молекуле фармакологически активного вещества другим может сопровождаться существенным изменением активности. Так, замена обеих метильных групп в молекуле новокаинамида на изопропиловый радикал приводит к снижению антиаритмической активности, а замена одной этильной группы на бензольное кольцо значительно увеличивает противоаритмическое действие. Дибензодиазепиновые аналоги производных фенотиазина, полученные при переходе от диалкиламиноалкильных производных дибензодиазепина (трициклических антидепрессантов) к диалкиламиноацильным, лишены антидепрессивной активности, но приобретают антиаритмические и противофибрилляторные свойства.

В ряде случаев фармакологическая активность веществ зависит не только от характера и последовательности атомов, но и от их пространственного расположения в молекуле относительно друг друга, т. е. от пространственной изомерии (стереоизомерии) молекул — оптической, геометрической и конформационной.

Для взаимодействия фармакологических веществ с рецепторами клеточных мембран важным является пространственное соответствие между функциональными группами молекул вещества и функциональными группами макромолекул рецептора,

т. е. наличие комплементарности. Чем выше степень комплементарности, тем большим сродством обладает ЛВ к соответствующим рецепторам и тем большей может быть его фармакологическая активность и избирательность действия. Этот факт объясняет различную активность стереоизомеров одного и того же вещества.

Так, по влиянию на артериальное давление левовращающий изомер адреналина значительно активнее правовращающего. Эти два соединения отличаются между собой только пространственным расположением структурных элементов молекулы, что оказалось решающим фактором для их взаимодействия с адренорецепторами.

Фармакологическая активность ряда соединений может быть и не столь связана с химическим строением. Степень фармакологической активности веществ с неспецифическим действием (например, снотворных и наркозных) зависит не столько от их способности взаимодействовать с определёнными рецепторами, как от насыщения ими определённых компартментов клеток. Разумеется, способность этих веществ насыщать ту или иную часть клетки обусловлена наличием соответствующих физических свойств (например, гидрофильностью или гидррофобностью, что количественно выражается коэффициентом распределения в системе масло/вода), а последние определяются структурой соединения. Однако в этом случае фармакологическую активность определяют не последовательность атомов или их пространственное расположение, а в большей мере отношение количества гидрофильных и гидрофобных атомных групп.

1.1. Роль физико-химических свойств лекарственных веществ в их взаимодействии с рецепторами

Физические свойства вещества (агрегатное состояние, степень измельчения или летучести, молекулярная масса, растворимость в воде и жирах, степень диссоциации) определяют характер, силу и скорость действия лекарственного средства как непосредственно, так и косвенно, поскольку именно физические свойства обусловливают его лекарственную форму и наиболее эффективный путь его введения в организм.

Большинство эффектов ЛВ формируется в результате их взаимодействия с клеточными участками связывания. Те участки, которые трансформируют это взаимодействие в наблюдаемый эффект, определяются как рецепторы ЛВ, а те участки связывания, которые его не опосредуют, называют местами потерь или «спящими» рецепторами (например, большинство белков плазмы). Само по себе взаимодействие ЛВ с любыми участками связывания представляет собой обычный физико-химический процесс между лигандом и биомолекулой.

Взаимодействие ЛВ с биоструктурами может быть необратимым и обратимым. Необратимым оно будет в случае образования ковалентной связи.

Химическая связь является ковалентной, если она образуется парой электронов, распределённой между двумя или большим числом атомов, которые обобществляют эту электронную пару. Если в ковалентной связи участвуют два идентичных атома, распределение обобществлённых электронов оказывается симметричным, поскольку они испытывают влияние двух одинаковых ядер. Такая связь называется неполярной, в этом случае центр распределения отрицательного заряда электронов совпадает с центром положительного заряда ядер. Химическая связь, при которой центр распределения отрицательного заряда электронов смещён вдоль оси связи относительно центра положительного заряда ядер, называется полярной ковалентной связью. Ковалентные связи образуются, в частности, фосфорорганическими и некоторыми химиотерапевтическими веществами при взаимодействии с биологическими субстратами. Действие таких веществ необратимо.

Большое значение имеет образование координационных связей, имеющих место в живой природе. Характерная особенность образующихся комплексных соединений — это наличие группировок, в которых число связей, образуемых центральными атомами, превышает их формальную высшую валентность. Возникновение координационных связей обусловлено передачей электронной пары с целиком заполненной орбитали лиганда (донора) на вакантную орбиталь центрального атома (акцептора) и образованием общей связывающей молекулярной орбитали. Следовательно, природа координационной связи не отличается от природы обычной полярной ковалентной связи. Различие состоит лишь в способе описания образования этих связей из составляющих фрагментов. В случае координационной связи электронная пара полностью поставляется одним фрагментом (лигандом), тогда как ковалентная связь формируется из неспаренных валентных электронов каждого фрагмента.

В координационных связях живых организмов присутствуют комплексные соединения некоторых металлов, в частности Fe, Cu, Mg, Mn, Mo, Co, с белками, витаминами и другими веществами, выполняющими специфические функции в обмене веществ. Образованные лекарственными веществами и антидотами стабильные соединения называют хелатными комплексами (например, комплекс унитиола с мышьяком или тетацинкальция со свинцом).

В процессе узнавания и фиксации ЛВ на физиологически важных структурах чаще всего устанавливаются обратимые связи (водородные, ионные, Ван-дер-Ваальсовы и др.). Водородные связи образуются в результате диполь-дипольного взаимодействия. Это особый вид трёхцентровой химической связи, в которой центральный атом водорода, соединённый ковалентной связью с электроотрицательным атомом, образует дополнительную связь с атомом, имеющим направленную вдоль линии этой связи неподелённую электронную пару. Большое значение имеют водородные связи при формировании структур белков, полисахаридов. Замыканием множественных молекулярных водородных связей между соответствующими парами пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК определяется также образование двойной спирали ДНК и, следовательно, природа генетического кода.

Немаловажную роль в механизме действия лекарственных препаратов играют ионные связи, в основе которых лежит электростатическое взаимодействие ионов.

Между соседними молекулами действуют довольно слабые силы притяжения. Эти силы называют силами Ван-дер-Ваальса. Последние намного слабее электростатических сил, действующих между ионами. Ван-дер-Ваальсовы силы участвуют в гидрофобных взаимодействиях и имеют отношение к стабилизации конформаций биополимеров и образованию биологических мембран. ЛВ, участвуя в гидрофобных взаимодействиях, изменяют структуру мембран и соответствующие биохимические и биофизические процессы.

Взаимодействие ЛВ с рецепторами характеризуется большим сродством и специфичностью.

Постулат П. Эрлиха *Corpora non agunt nisi fixata* (вещества не действуют, пока не свяжутся), вызвавший столь бурные споры при жизни учёного, сейчас ни у кого не вызывает сомнения. Учение Эрлиха о рецепторах ЛВ — методологическая основа современной фармакологии, база поиска новых мишеней и возможностей их регуляции с помощью химических соединений, будь то низкомолекулярные органические молекулы или избирательные антитела («таргетные» ЛВ). Конечно, есть определённые ЛВ, действующие по другим механизмам, однако эффекты подавляющего большинства из них связаны с физико-химическими взаимодействиями между молекулами ЛВ и специфическими молекулами, их частями или молекулярными комплексами живого организма, т. е. «узнающими» частями рецепторов. Взаимодействие между молекулами ЛВ и рецепторами следует рассматривать как взаимную адаптацию их

структур, сопровождающуюся повышением свободной энергии. Подобные изменения вызывают активацию комплекса лиганда с рецептором и имеют значение в первичной фармакологической реакции. При сопряжении молекул ЛВ и рецептора происходят изменения их пространственной ориентации, перераспределение электростатических сил, в результате чего биологическая молекула активируется, что ведёт к изменениям в среде, окружающей рецептор («биофаза»), и, в конце концов, приводит к эффекту.

Понятием «биофаза» пользуются при обозначении биологических субстратов, находящихся в непосредственной близости с рецептором, его своеобразную «окружающую среду», играющую роль трансформирующей системы и в значительной степени определяющую характер стимула, возникающего в организме.

1.2. Рецепторные механизмы действия лекарственных веществ

На рубеже XIX–XX столетий Паулем Эрлихом было предсказано существование на поверхности живых клеток специальных белковых структур (рецепторов), определяющих их избирательную чувствительность к ЛВ. Это предположение легло в основу теории рецепции, значительно опередившей своё время, поскольку лишь спустя десятилетия была выяснена химическая природа рецепторных молекул и определены биохимические принципы их функционирования. Теперь рецепторная теория стала методологической основой поиска новых ЛВ с направленным действием.

При попадании любого ЛВ в организм оно связывается макромолекулами крови или тканей. Эти молекулы можно разделить на рецепторы и акцепторы. Связывание с рецепторами приводит к развитию фармакологического или токсического эффекта, а связывание с акцепторами («молчащими» рецепторами) сопровождается депонированием, транспортом или элиминацией ЛВ.

У млекопитающих клетки имеют тот или иной набор рецепторов, с помощью которых осуществляются обмен информации и коммуникация между ними. Рецепторы — это генетически детерминированные, мобильные, пластичные, главным образом белковые, структуры, функции которых заключаются в узнавании химического сигнала с последующей его трансформацией в адекватный ответ клетки или популяции клеток [2].

В состав рецепторов входит полимерная молекула как носитель биологической специфичности и как конформационно подвижная структура, способная за счёт изменения конформации преобразовывать молекулярный сигнал в биохимическую реакцию. Как правило, в рецепторных системах физиологически активных веществ можно выделить три части:

1) часть, ответственную за распознавание и связывание низкомолекулярного соединения (лиганда);

2) часть, ответственную за передачу молекулярного сигнала на эффекторную систему; её называют трансдуктором;

3) часть, ответственную за возникновение биохимических изменений в клетке (фермент, катализирующий образование вторичного посредника, ионный канал); её называют эффектором.

Выделяют несколько этапов взаимодействия ЛВ с рецепторами от момента введения ЛВ до фармакологического эффекта.

1-й этап. После введения ЛВ в среде, окружающей рецепторы, т. е. в биофазе, создаётся его определённая концентрация, зависящая как от свойств фармакологического вещества (растворимость, полярность, способность к диссоциации, пространственная ориентация и др.) и рецептора (количество, расположение, порог активации и др.), так и от свойств биофазы, от путей введения и избранной лекарственной формы.

2-й этап. Собственно взаимодействие молекул ЛВ и рецептора, их взаимоизменение, степень которого зависит от внутренней активности комплекса ЛВ с рецептором. Этот этап завершается формированием так называемого стимула.

3-й этап. Появление стимула является пусковым механизмом в формировании конкретного фармакологического эффекта, который является как бы видимой, внешней стороной стимула. Отношения между стимулом и эффектом могут быть линейными, нелинейными, по закону «всё или ничего» и др.

Рецепторы обеспечивают передачу сигнала из внешней среды внутрь клетки и его трансформацию в ответную реакцию нужной клетки в нужное время.

1.2.1. Молекулярная природа рецепторов. Большинство рецепторов — это белки, к которым в процессе посттрансляционных модификаций могут присоединяться углеводы, липиды, фосфаты

Рецепторы узнают и связывают лиганды с высоким сродством и специфичностью, трансформируют полученный сигнал в изменение таких клеточных функций, как метаболизм, секреция, сокращение, ионные токи, рост, экспрессия генов, восприятие света, вкуса и запаха. Кроме того, рецепторы принимают участие в межклеточных взаимоотношениях, взаимодействии патогена с клеткой и транспорте молекул.

Водорастворимые лиганды связываются с рецепторами плазматической мембраны, а внутриклеточные (ядерные) рецепторы связывают лиганды, способные проникать через плазматическую мембрану.

За последние десятилетия благодаря развитию методов препаративной биохимии и молекулярной биологии выделены отдельные рецепторы ЛВ и определены их характеристики: молекулярная масса, химический состав, конформация, локализация, аминокислотная последовательность, гены, кодирующие их биосинтез и др.

В наибольшей степени изучены рецепторы, представляющие собой регуляторные белки, которые опосредуют действие эндогенных биологически активных веществ — нейромедиаторов, гормонов, а также многих ЛВ.

Другой класс рецепторов — белки со специализированной функцией: ферменты, мембранные переносчики, а также нуклеиновые кислоты.

В любом случае рецептор — это макромолекула, которая кроме белка и нуклеиновой кислоты может включать в свой состав липиды, углеводы, металлы или различные кофакторы.

Клеточные рецепторы различаются по своей локализации и подвижности. Большинство рецепторов локализовано в плазматической мембране. Эти рецепторы имеют различную степень фиксации: они могут быть прочно связанными со структурными белками мембран, а могут свободно передвигаться в латеральном направлении и при связывании с ЛВ образовывать группировки, или кластеры.

Если число ныне известных рецепторов составляет уже несколько сотен, то биохимических сигнальных механизмов их функционирования намного меньше, т. е. рецепторы с различной «узнающей» частью могут иметь одинаковую трансдукторную часть, передающую молекулярный сигнал на эффекторную систему.

По своей локализации в клетке все рецепторы ЛВ можно разделить на 2 основные группы.

1. Рецепторы ЛВ, локализованные в плазматической мембране, или трансмембранные рецепторы. Это рецепторы, которые входят в состав клеточной мембраны. Получая химическую информацию от внеклеточного компартмента, рецептор передаёт её внутриклеточному компартменту.

2. Внутриклеточные рецепторы. Эти рецепторы связывают липидорастворимые лиганды и регулируют транскрипционую активность хроматина.

1.2.2. Рецепторы ЛВ, локализованные в плазматической мембране. При изучении механизмов функционирования данных рецепторов было установлено, что, несмотря на их большое количество (более сотни), реализация их активности опосредована лишь тремя основными механизмами. На этом основании выделяют 3 группы тарнсмембранных рецепторов.

1. Рецепторы, обладающие внутренней ферментативной активностью в своей цитозольной части. Эти рецепторы имеют ферментативную активность в цитозольном домене. Они представлены одной трансмембранной макромолекулой.

Регуляция активных мембранных ферментов происходит при непосредственном включении рецептора в состав данного фермента. Лигандами таких рецепторов являются инсулин, эпидермальные и тромбоцитарные факторы роста. Такой рецептор обладает тирозинкиназной активностью, и связывание лиганда по аллостерическому механизму приводит к изменению активности фермента. Образование комплекса лиганд–рецептор индуцирует аутофосфорилирование тирозиновых остатков цитоплазматического домена тирозинкиназы, что сопровождается изменением мембранного транспорта ионов и метаболитов. Примером лекарственного средства, действующего на данный механизм, может служить ингибитор тирозинкиназы для лечения хронического миелолейкоза иматиниб.

2. Рецепторы, формирующие ионный канал. Эти рецепторы характеризуются ионной селективностью. Они локализованы в синапсах и характеризуются чувствительностью к нейромедиаторам. Связывание лиганда трасформируется в электрический сигнал. Возбуждающие нейромедиаторы (ацетилхолин, глутамат, серотонин), увеличивая проницаемость для ионов натрия, вызывают деполяризацию постсинаптической мембраны. Ингибирующие нейромедиаторы (ГАМК, глицин), вызывая открытие хлорных каналов, приводят к гиперполяризации.

Механизм функционирования данных рецепторов заключается в изменении проницаемости мембранного ионного канала, часть которого включает рецептор. Ионные каналы плазматических мембран образуют поры, через которые могут проникать в клетку ионы по электрохимическому градиенту. Природные лиганды, такие как ацетилхолин, ГАМК и возбуждающие аминокислоты (аспартат, глутамат, глицин), через рецепторы ионных каналов регулируют ионную проницаемость плазматических мембран. В случае активации этих рецепторов имеет место самый быстрый ответ клетки — через несколько миллисекунд (такая скорость нужна для переноса информации через синапс). Для реализации других сигнально-рецепторных механизмов необходимы секунды, минуты или даже часы.

Эффекты ЛВ, открывающих ионные каналы, опосредованы изменением внутриклеточной концентрации ионов. Некоторые ЛВ, связываясь с ионными каналами, открывают их по аллостерическому механизму или повышают способность эндогенных соединений открывать данные каналы. ЛВ, открывающие каналы для калия, применяемые для стимуляции роста волос (миноксидил). ЛВ, открывающие хлорный канал $ГАМК_А$ — рецепторного комплекса, применяют при повышенной тревожности (алпразолам; мидазолам). Некоторые ЛВ, связываясь с ионными каналами, непосредственно закрывают их просвет или уменьшают их проницаемость по аллостерическому механизму. Эффекты ингибиторов ионных каналов опосредованы изменением внутриклеточной концентрации ионов. Блокаторы кальциевых каналов используют для лечения стенокардии и гипертензии (амлодипин — Норваск, дилтиазем), блокаторы натриевых каналов — для лечения аритмий сердечных сокращений (лидокаин, амиодарон) [7].

3. Рецепторы, взаимодействующие с гуанилатсвязывающими (G) белками, которые являются трансдукторами (передатчиками) сигнала.

Механизм функционирования данных рецепторов заключается в изменении уровня вторичного посредника в клетке вследствие активации рецептора.

Большинство внеклеточных лигандов действуют посредством изменения концентрации вторичных посредников — циклических нуклеотидов, ионов, фосфоинозитидов.

В реализации этого эффекта, как правило, участвуют три компонента.

Первый компонент — это рецептор, расположенный на поверхности клетки. В результате взаимодействия лиганда с рецептором происходит конформационное изменение последнего, что в свою очередь приводит к перестройке расположенного вблизи трансдуктора (2-й компонент) — гуанилатсвязывающего G-белка. G-белок передаёт полученный сигнал на эффекторную систему (3-й компонент) — фермент или ионный канал.

Функционирование G-белка заключается в высвобождении гуанозиндифосфатата (ГДФ) из связи с белком и в последующем присоединении гуанозинтрифосфатата (ГТФ) к нуклеотидсвязывающему участку белка. До тех пор пока не происходит гидролиз ГТФ, имеет место действие G-белка на эффекторную систему. После гидролиза ГТФ и превращения его в ГДФ для нового отсоединения ГДФ необходим повторный стимул от узнающей части рецепторной системы. G-белки в зависимости от своей молекулярной природы могут либо активировать (G_s-белок) или ингибировать (G_i-белок) сопряжённый с ним фермент. Рецепторы, сопряжённые с G-белками, имеют структурное сходство. В частности, рецептор для симпатолитических катехоламинов и мускариновых холиномиметиков состоит из полипептидной цепи, пересекающей плазматическую мембрану 7 раз и имеющей N-концевую и C-концевую части вне и внутри клетки соответственно. Внутримембранные области этих рецепторов имеют участки с одинаковой аминокислотной последовательностью, что, возможно, свидетельствует об одинаковых механизмах конформационных изменений, возникающих после связывания лиганда с рецептором. От структуры C-концевой части этих рецепторов зависит характер их взаимодействия с G-белком.

Вторичные посредники. Биологическая роль вторичных посредников рассматриваемых рецепторов заключается в усилении молекулярного сигнала внеклеточного лиганда. К вторичным посредникам (вторичным мессенджерам) относятся циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), Ca^{2+}, инозитолтрифосфат и диацилглицерин. Известны многие рецепторы, содержащие и стимулирующие аденилатциклазу, катализирующую образование цАМФ, а также рецепторы, содержащие и приводящие к ингибированию аденилатциклазы [18].

Циклический аденозинмонофосфат. Наиболее изучен в качестве вторичного посредника цАМФ. Он образуется из АТФ под воздействием аденилатциклазы, а разрушается, превращаясь в 5′АМФ, в присутствии фосфодиэстеразы. Точкой приложения действия цАМФ является цАМФ-зависимая протеинкиназа, которая состоит из регуляторной и каталитической субъединиц. цАМФ, присоединяясь к регуляторной субъединице, индуцирует способность каталитической субъединицы фосфорилировать субстратные белки путём переноса фосфатной группы от АТФ. В разных клетках субстратные белки неодинаковы. В частности, в печени фосфорилирование гликогенсинтетазы регулирует обмен углеводов, в адипоцитах фосфорилирование липазы — высвобождение жирных кислот, в мышцах фосфорилирование L-цепей миозина — расслабление гладких мышц. цАМФ-зависимое фосфорилирование обратимо благодаря действию специфических и неспецифических фосфатаз [21].

цАМФ является посредником иммобилизирующего действия адреномиметиков на углеводы и липиды, водосберегающего действия вазопрессина, Ca^{2+}-регулирующего действия паратгормона и многих других эндокринных и нейрональных процессов.

Гидролиз цАМФ катализируется некоторыми фосфодиэстеразами, которые могут быть активированы Ca^{2+} вместе с кальмодулином, а также самим цАМФ.

Циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). цГМФ выполняет роль вторичного посредника гораздо реже, чем цАМФ, хотя механизмы образования и деградации у этих нуклеотидов сходные. Образование цГМФ катализируется гуанилатциклазой, а его деградация — фосфорилазой. цГМФ стимулирует цГМФ-зависимую протеинкиназу, а его действие обращается фосфорилированием субстратов. Увеличение внутриклеточного уровня цГМФ сопровождается расслаблением гладких мышц сосудов вследствие фосфорилирования лёгких цепей лизина и происходит в результате взаимодействия с рецепторами предсердного натрийуретического фактора.

Окись азота (NO). С цГМФ тесно связана ещё одна система вторичных посредников, которая принимает участие в метаболизме азота. Окись азота представляет собой нейромедиатор нового класса. Она идентична эндотелиальному расслабляющему фактору, который был открыт ранее как соединение, стимулирующее образование цГМФ и последующее расширение кровеносных сосудов [20].

Молекула NO существует в течение 6–10 с, после чего превращается в присутствии кислорода и воды в нитраты и нитриты. Образуется NO при участии фермента синтазы окиси азота, зависимой от кальмодулина и кальция. Данный фермент катализирует превращение аргинина в NO и цитрулин [19].

Кроме эндотелиальных клеток, где NO образуется под воздействием ацетилхолина, система синтеза NO обнаружена в головном мозге и макрофагах, где стимуляторами его образования являются интерферон и глутамат соответственно. В нейрональной ткани мишенью действия NO является атом железа в молекуле фермента гуанилатциклазы, катализирующей образование цГМФ. Связывание NO вызывает изменения пространственной структуры гемовой группы, приводящие к усилению превращения ГТФ в цГМФ. При воздействии клеток иммунной системы на опухолевые клетки образование NO необходимо для их разрушения, так как NO подавляет цикл Кребса, транспорт электронов и синтез ДНК.

Ионы кальция (Ca^{2+}). Ca^{2+} регулирует клеточную активность взаимодействием с несколькими белковыми медиаторами, но самые главные из них — фермент протеинкиназа С и белок кальмодулин [17]. Протеинкиназа С, как и цАМФ-зависимая протеинкиназа, имеет множество субстратов, включая некоторые белки, вовлечённые в другие сигнальные системы. Активация протеинкиназы С кальцием потенцируется диацилглицерином (ДАГ) — вторым продуктом гидролиза инозитолдифосфата (ИФ2) до инозитотрифосфата (ИФ3), катализируемым фосфолипазой С. Спектр регуляторной активности кальмодулина также довольно широк.

Кальций, поступающий в цитозоль, быстро откачивается из него, в основном за пределы клетки (позже, после удаления стимула, клетка восстанавливает запас кальция).

Инозитолтрифосфат. Молекула ИФ3 гидрофильна и может легко перемещаться внутри клетки, связываясь со своими «мишенями». Основная функция ИФ3 — высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} из депо (внутриклеточные органеллы). Полагают, что ИФ3 путём прямого связывания открывает кальцийспецифичные каналы в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме в несколько раз (нормальная концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме составляет 0,1 мкМ) [17]. Однако этот подъём концентрации кальция кратковременен, так как часть ИФ3 подвергается быстрому дефосфорилированию специальной фосфатазой, тем самым происходит деактивация ИФ3. Однако некоторое количество ИФ3 под действием специфической киназы превращается в инозитол-1,3,4,5-тетрафосфат (ИФ4), т. е. часть ИФ3 фосфорилируется. Полагают, что ИФ4 вызывает более продолжительный и медленный эффект, нежели ИФ3. Кроме

того, часть ИФ3 превращается в другие фосфоинозитиды (частично — циклические), некоторые из них имеют физиологическое значение.

Диацилглицерин. Диацилглицерин активирует специфическую протеинкиназу С, фосфорилирующую функционально различные белки (в зависимости от типа клетки).

Протеинкиназа С располагается преимущественно в цитоплазме до момента появления там ДАГ и кальция. Как только ДАГ вместе с фосфолипидом внутреннего слоя плазматической мембраны фосфатидилсерином присоединяются к протеинкиназе С, резко повышается сродство С-киназы к кальцию. После присоединения к протеинкиназе С кальция она активируется. Однако эта активация кратковременна, так как через несколько секунд ДАГ фосфорилируется до фосфатидной кислоты и расщепляется с образованием арахидоновой кислоты. Активированная протеинкиназа С является серин- и треонинспецифичной протеинкиназой, функция которой заключается в фосфорилировании специфических мишеней и аутофосфорилировании.

На примере основных вторичных посредников можно представить, насколько высокоинтегрированны различные «сигнальные пути», инициируемые образованием различных комплексов ЛВ — рецепторы.

1.2.3. Внутриклеточные (ядерные) рецепторы, регулирующие экспрессию гена. Специализированная система передачи сигнальной информации существует для липофильных лигандов, проникающих через клеточные мембраны. Для этих лигандов, включающих стероиды и другие полициклические соединения, обнаружены цитоплазматические, митохондриальные и ядерные рецепторы. В ряде случаев, например при связывании глюкокортикоидов, происходит изменение локализации рецепторов — перемещение их из цитоплазмы в ядро. В ядре активированные стероидом рецепторы стимулируют транскрипцию генов и затем биосинтез белков, которые и ответственны за реализацию биологической активности стероида. Такой механизм действия стероидов обусловливает наличие лаг-периода ($\sim$30 мин — несколько часов) развития фармакологического эффекта и его продолжительность в течение часов или дней (время жизни белка) [12].

Ядерные рецепторы находятся внутри клетки и после активации связываются с регуляторными областями ДНК, модулируя экспрессию гена. Ядерные рецепторы предназначены для опосредования влияния внутриклеточных эндогенных лигандов на экспрессию генов. Некоторые агонисты, связываясь с ядерными рецепторами, стимулируют развитие эффекта, а другие агонисты повышают способность эндогенных лигандов активировать рецепторы (агонисты глюкокортикоидных рецепторов для лечения воспалений: гидрокортизон и дексаметазон; агонисты эстрогенных рецепторов для заместительной гормональной терапии у постменопаузальных женщин: эстрадиола валерат).

Антагонисты, связываясь с ядерными рецепторами, не активируют их, но предотвращают транслокацию рецепторов в ядро, их связывание с ДНК и изменение экспрессии генов. При связывании антагонистов с ядерными рецепторами эндогенные лиганды не связываются с рецепторами и не могут изменить экспрессию генов. Многие антагонисты связываются с участком рецептора для эндогенных агонистов и стерически предотвращают связывание агониста. В ряде случаев антагонисты могут связываться с аллостерическим участком рецептора, вызывая вытеснение эндогенного агониста из активного участка рецептора.

Антагонисты минералокортикоидных рецепторов применяют для уменьшения отёков при циррозе печени и сердечной недостаточности (спиронолактон — Альдактон). Антагонисты эстрогенных рецепторов применяют для профилактики и лечения рака молочной железы (тамоксифен).

Таблица 1.1

Основные фармакологически значимые типы клеточных рецепторов человека

Типы рецепторов	Типичная морфология рецепторной молекулы	Механизм передачи сигнала от рецептора	Примеры рецепторов
I тип. Рецепторы, входящие состав ионных каналов	Трансмембранный рецептор состоит из субъединиц, формирующих ионный канал, проницаемость которого регулируется лигандом, взаимодействующим с какой-либо субъединицей на поверхности клетки	Изменение проницаемости для ионов (обычно натрия или хлора) приводит к изменению мембранного потенциала	Н-холинорецептор NMDA-рецептор Каинатный рецептор Квисквалатный рецептор Рецептор аспартата $ГАМК_А$-рецептор Глициновый рецептор
II тип. Рецепторы, сопряжённые с G-белками	Одноцепочечный полипептид, несколько раз пронизывающий цитоплазматическую мембрану Гликозилированный N-конец находится на поверхности мембраны, а С-конец — в цитоплазме (в его состав входит сериновый остаток — мишень для фосфорилирования) С-концевая часть сопряжена с G-белком, состоящим из субъединиц α (связывают GDP, обладают GTP-азной активностью), β и γ (в виде пары взаимодействуют с адналитциклазой или фосфолипазой)	1. Регуляция активности аденилитциклазы при участии стимулирующего G_s-белка или ингибирующего G_i-белка Изменение уровня цАМФ приводит к изменению активности цАМФ-зависимой протеинкиназы и последующему фосфорилированию определенных внутриклеточных киназ и других белков, опосредующих клеточный ответ	Рецепторы, опосредующие активацию аделиатциклазы: β_1-, β_2-, β_3-адренорецепторы Рецепторы ТТГ, АКТГ, ЛГ Рецептор паратгормона (в кости) Рецептор вазопрессина (в почках) Рецептор глюкагона (в жировой ткани) H_2-гистаминовый рецептор D_1-, D_5-рецепторы дофамина $5\text{-}HT_{1A}$-серотониновые рецепторы Рецепторы, опосредующие ингибирование аденилатциклазы: α_2-адренорецептор (в β-клетках поджелудочной железы) M_2 — холинорецептор D_2-, D_3-, D_4-рецепторы дофамина μ- и Δ-опиоидные рецепторы $5\text{-}HT_{1B}$-, $5\text{-}HT_{1D}$-серотониновые рецепторы α_1-Адренорецептор

Таблица 1.1 (*окончание*)

Типы рецепторов	Типичная морфология рецепторной молекулы	Механизм передачи сигнала от рецептора	Примеры рецепторов
II тип. Рецепторы, сопряжённые с G-белками	То же	2. Регуляция активности фосфолипазы при участии G_p-белка В результате активации фосфолипазы С происходит гидролиз инозитолдифосфата (ИФ2) до инозитолтрифосфата (ИФ3) и диацилглицерина (ДАГ) ИФ3, внутриклеточный, открывая Са-специфичные каналы, регулируют уровень Са ДАГ, катализируя высвобождение арахидоновой кислоты, стимулирует образование простагландинов и лейкотриенов, либо активирует протеинкиназу С, фосфорилирирующую ионные каналы	Мускариновые M_1- и M_3-холинорецепторы 5-HT_{1C}-, 5-HT_2-серотониновые рецепторы Ангиотензиновый рецептор Вазопрессиновый рецептор (печень) Рецептор тиреотропин-релизинг-гормона $\varkappa$-Опиоидный рецептор (?)
III тип. Рецепторы с каталитической тирозинкиназной активностью	Одноцепочечные трансмембранные полипептиды Их С-цитоплазматический конец имеет каталитическую тирозинкиназную активность	Связывание рецептора с лигандом приводит к активации тирозиновой протеинкиназы и аутофосфорилированию	Инсулиновый рецептор Рецептор соматомедина-С (IGF-1) Рецептор фактора роста эпидермиса (EGF) Рецептор фактора роста производных тромбоцитов (PDGF) Рецептор колоний-стимулирующего фактора-1 (CSF-1) Рецепторы неизвестных гормонов/онкогенов: CNeu, cRos, cKit, cMet, cTrk
IV тип. Внутриклеточные рецепторы стероидных, тиреоидных гормонов, ретиноидов и витамина D	Молекула состоит из трех доменов: гормонсвязывающего (ближе к С-концу), центрального (ДНК-связывающего), N-терминального (домен у N-конца, активирует транскрипцию) Молекула рецептора в неактивном состоянии связана с ингибиторным белком, блокирующим ДНК-связывающий домен рецептора	Присоединение гормона к рецептору изменяет транскрипцию соответствующего гена, т. е. первичный ответ, а продукты функционирования гена (белки, ферменты) опосредуют вторичный ответ гормона	Рецепторы стероидных гормонов Рецепторы тиреоидных гормонов Рецепторы ретиноидов Рецептор витамина D

Следует отметить, что для стероидов имеются не только внутриклеточные, но и плазмомембранные рецепторы, которые сопряжены с системами образования вторичных посредников, регулирующих процессы фосфорилирования внутриклеточных структур, в том числе и самих цитозольных рецепторов (после этого у них появляется способность проникать в ядро) [16].

Таким образом, во всех сигнальных механизмах происходят процессы обратимого фосфорилирования — как универсальный этап регуляции биохимических реакций при участии рецепторов ЛВ.

Заканчивая рассмотрение молекулярных механизмов действия ЛВ, подчеркнём, что их изучение важно как для правильного использования клиницистами существующей номенклатуры ЛВ, так и для поиска ЛВ, взаимодействующих не только с «узнающими» частями рецепторов, но и с отдельными структурами, обеспечивающими этапы рецепторных механизмов. К последним относятся специфические G-белки, киназы, ионные каналы, фосфатазы или ферменты, катализирующие деградацию вторичных посредников.

В соответствии с рецепторными механизмами действия ЛВ все рецепторы можно разделить на 4 типа (табл. 1.1).

1.3. Зависимость доза–эффект для лекарственных веществ

Одна из актуальных задач современной биохимической фармакологии — выявление параметров зависимости между величиной воздействия (дозой ЛВ) и ответом биологической системы (эффектом). Для её решения было предложено большое число теорий: Кларка (1926), Стеферсона (1956), Карлина (1957), Патона (1961), Ариенса (1979), П. В. Сергеева и Н. Л. Шимановского (1999) и др. Эти теории позволяют описывать кинетику взаимодействия лиганда с рецептором, т. е. первичную реакцию в процессе формирования клеточного ответа:

$$L + R \longleftrightarrow LR \rightarrow \text{клеточный ответ}, \qquad (1)$$

где L — лиганд; R — рецептор; LR — лиганд-рецепторный комплекс.

Схема (1) описывает формирование так называемой монофазной зависимости доза–эффект, для которой характерна стимуляция (угнетение) клеточного ответа до тех пор, пока не достигнет максимума (минимума) определённая физиологическая функция (рис. 1.1).

Действительно, для многих биологически активных веществ характерны такие зависимости. Достаточно иллюстративны эти зависимости для эстрогенов. Для них описаны монофазные зависимости доза–эффект в случае регуляции экспрессии гена галанина в клетках передней части гипофиза крысы, регуляции синтеза аполипопротеинов AI, CII, B и E в клетках гепатомы человека, внутриклеточной концентрации ионов кальция для клеток, содержащих только один тип эстрогенных рецепторов: сперматозоидов, клетках глиомы и др.

Однако в ряде экспериментов были обнаружены и более сложные зависимости доза–эффект, для которых характерна начальная стимуляция клеточного ответа низкими дозами и последующее угнетение большими дозами (так называемые бифазные зависимости) (рис. 1.2).

В частности, зависимости такого рода описаны для случая регуляции аффинности внутриклеточных инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов, биосинтеза цАМФ в лимфоцитах человека под влиянием опиоидных пептидов [6], пролиферации спленоцитов мыши под влиянием простагландина E_2 [8], а также и для эстрогенов (ссылки на источники приведены ниже). Упомянутые нами теории не позволяют

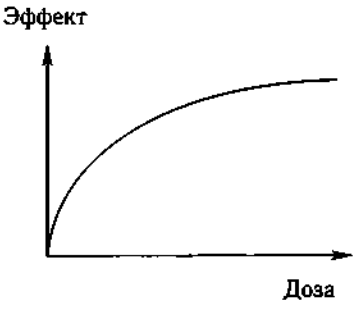


Рис. 1.1. Монофазная зависимость доза–эффект

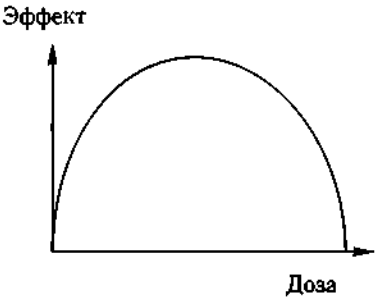


Рис. 1.2. Бифазная зависимость доза–эффект

объяснять механизмы формирования сложных зависимостей доза–эффект, достаточно часто встречающихся в эксперименте. Поэтому важно учитывать существование возможных механизмов формирования сложных зависимостей доза–эффект, которые можно проиллюстрировать на примере эстрогенов.

1.3.1. Бифазные зависимости доза–эффект. Бифазные зависимости доза–эффект показали, что в концентрации 10^{-10}–10^{-7} М эстрогены стимулируют, а в концентрации 10^{-6}–10^{-5} М угнетают активность синтазы оксида азота в клетках нейронального происхождения. Данный эффект опосредуется через Ca^{2+}-зависимый кальмодулин, активность которого изменяется так же, как и активность синтазы оксида азота. β-эстрадиол в концентрации 10^{-11} М стимулировал рост культуры gh-клеток опухоли гипофиза, а в концентрации 10^{-9} М угнетал. У овариоэктомированных овец высокие концентрации эстрогенов угнетают синтез лютеинизирующего гормона, а низкие — стимулируют его.

Для формирования бифазных зависимостей доза–эффект могут иметь значение следующие механизмы:

1. Наличие гетерогенных рецепторов, одни из которых стимулируют клеточный ответ, другие — угнетают его. Формально-кинетическая схема в этом случае записывается так:

$$\begin{aligned} &L + R \longleftrightarrow LR \rightarrow \text{«положительный» клеточный ответ,} \\ &L + R' \longleftrightarrow LR' \rightarrow \text{«отрицательный» клеточный ответ,} \end{aligned} \qquad (2)$$

где L — эстроген, R — эстрогенные рецепторы первого типа, R′ — эстрогенные рецепторы второго типа, LR, LR′ — лиганд-рецепторные комплексы с рецепторами первого и второго типа.

Механизм, описываемый схемой (2), имеет место при регуляции активности синтазы оксида азота в аорте крыс; стимулирующий эффект опосредовался через α-тип эстрогенных рецепторов, угнетающий — через β-тип. Аналогичный характер дозовой зависимости наблюдался при экспрессии белка pS2 в гормонозависимых опухолях молочной железы, но идентификация типов эстрогенных рецепторов не проводилась.

Известно, что существует тканевая и индивидуальная вариабельность распределения эстрогенных рецепторов типа α и β [8]. Так как эффекты, опосредуемые этими типами рецепторов, различны, то следует ожидать, что одни и те же дозы эстрогенов у разных людей, в разных состояниях, в разных органах и тканях могут оказывать диаметрально противоположные эффекты: стимулирующие или угнетающие. Частично такая вариабельность эффектов может быть связана со вторым механизмом формирования бифазных зависимостей доза–эффект: даун-регуляцией, наблюдающейся

при длительном нахождении эстрогенов в высоких концентрациях в микроокружении рецепторов [8].

2. *Даун-регуляция.* Формально процесс описывается схемой:

$$\begin{gathered} L + R \longleftrightarrow LR \rightarrow \text{клеточный ответ}, \\ LR \xrightarrow{L} \text{уменьшение числа «активных» рецепторов}. \end{gathered} \tag{3}$$

Данный процесс можно рассматривать как приспособительный, предотвращающий поступление в клетку избытка афферентной информации. Следует считать, что механизм (3) лежит в основе феномена привыкания и развития толерантности (нечувствительности, невосприимчивости) к действию многих лекарственных веществ (Варфоломеев, Гуревич, 1999). В частности, для эстрогенных рецепторов этот процесс был подробно изучен при стимуляции клеток уретры ягнёнка 17-β-эстрадиолом. Было показано, что до назначения 17-β-эстрадиола концентрация эстрогенных рецепторов и экспрессия их мРНК в клетках была существенно выше, чем после 12-дневной терапии.

1.3.2. Бимодальные зависимости доза–эффект. В последние годы появились данные о том, что могут существовать более сложные зависимости доза–эффект, чем бифазные [6]. К ним относятся бимодальные зависимости доза–эффект (рис. 1.3).

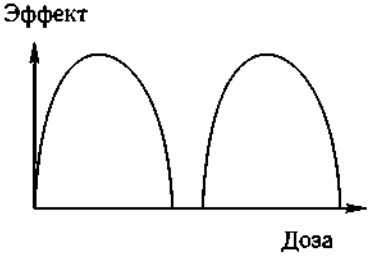


Рис. 1.3. Бимодальная зависимость доза–эффект

Для них характерна начальная стимуляция малыми дозами, угнетение эффекта при их возрастании, повторная стимуляция эффекта при дальнейшем увеличении дозы и, наконец, супрессия биологического ответа на чрезмерно большие дозы. Таким образом, на зависимости доза–эффект наблюдаются два максимума (моды), из-за чего эти зависимости и получили своё название. Для эстрогенов бимодальные зависимости доза–эффект описаны в работе [15]. Было показано, что 17-β-эстрадиол обладает бимодальным стимулирующим действием на высвобождение пролактина GH_3/B_6-клетками (опухоль гипоталамуса) с максимумами эффекта при пикомолярных и наномолярных концентрациях.

С нашей точки зрения, наиболее вероятно в случае эстрогенов следующее предположение о механизме формирования бимодальной зависимости доза–эффект. Известно, что эстрогены имеют как геномные, так и негеномные эффекты. При этом негеномные эффекты, как правило, связаны с регуляцией концентрации свободных внутриклеточных ионов Ca^{2+} и наблюдаются в области более низких концентраций эстрогенов, чем геномные [8]. Кроме того, известно, что внутриклеточное накопление Ca^{2+} может стимулировать выделение ранее синтезированных гормонов из секреторных гранул клеток [1]. Можно предположить, что в малых дозах 17-β-эстрадиол влияет на концентрацию внутриклеточного Ca^{2+}, вначале через α-тип эстрогенных рецепторов увеличивая её, а затем через β-тип — уменьшая. В тот момент, когда концентрация Ca^{2+} внутри клеток окажется максимальной, будет наблюдаться первый

максимум активации высвобождения пролактина. Дальнейшее увеличение концентрации 17-β-эстрадиола может привести к влиянию на геномные процессы регуляции синтеза белков, ответственных за биосинтез пролактина. Можно предположить, что это влияние также окажется бифазным, при этом второму максимуму активации выделения пролактина под влиянием 17-β-эстрадиола будет соответствовать максимум биосинтеза предшественника пролактина.

Временные зависимости эффектов эстрогенов. Многоэтапность действия эстрогенов может изменять направленность их действия на разных промежутках времени после их ведения. При исследовании влияния эстрадиола (подкожно, 10 мг/кг) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в дерме и эпидермисе кожи крыс в зависимости от времени (5, 30 мин, 1, 2, 3, 6, 12 и 24 ч) после его введения оказалось, что влияние эстрадиола на интенсивность ПОЛ (оценивали по величине амплитуды «медленной вспышки» железоиндуцированной хемилюминесценции и содержанию конечных продуктов липопероксидации, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) характеризуется статистически достоверным двухфазным действием. Через 1 ч после введения эстрадиола наблюдалось максимальное снижение уровня окисления липидов (наиболее выражено оно было в эпидермисе — около 45% от контроля), а через 3 ч после его введения имело место максимальное увеличение ПОЛ (в наибольшей степени оно было выражено в дерме — около 39% от контроля). Возможно, это связано с тем, что сразу после введения эстрадиол, как «истинный» антиоксидант, уменьшает количество в ткани перекисных радикалов, а через 2 ч могут начинать проявляться другие механизмы, в частности стимуляция фосфоинозитольного цикла, сопровождающаяся активацией НАД(Ф)-оксидазы с последующим усиленным образованием активных форм кислорода, а также «включение» арахидонового каскада, сопряжённого с накоплением кислородных и липидных радикалов.

Таким образом, рассмотрение различных вариантов формирования интегрального клеточного ответа при действии физиологически активных веществ свидетельствует о возможности существования нескольких типов зависимостей доза–эффект: монофазных, бифазных, бимодальных (не исключено в ряде случаев существование полимодальных). Чем сложнее механизм действия физиологически активного вещества, тем сложнее будет форма таких зависимостей [14]. В особенности это относится к веществам, имеющим рецепторы на плазматической мембране и внутри клеток, в частности к стероидным гормонам. На примере эстрогенов показано, что зависимости доза–эффект имеют более сложный характер, чем простая стимуляция (угнетение) — выход на плато: для отдельных эффектов 17-β-эстрадиола описаны монофазные, бифазные и бимодальные зависимости. Следовательно, для получения полной информации о характере действия того или иного физиологически активного вещества необходимо определение зависимостей доза–эффект в максимально возможно широком диапазоне концентраций и времён.

1.4. Гетерогенность рецепторов лекарственных веществ

С каждым годом количество рецепторов для физиологически активных веществ, как и само число известных нам лигандов, возрастает. Причём появляются сведения не только о новых типах рецепторов, но и их новых подтипах, что подтверждает принцип рецепторной гетерогенности.

Иллюстрацией прикладного значения развития учения о рецепторах для физиологически активных веществ могут быть работы Дж. Блэка, в результате которых были внедрены в клиническую практику β-адреноблокатор пропранолол для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [10] и блокаторы H_2-гистаминовых рецепторов буримамид и цинетидин, как эффективные противоязвенные средства. Другим при-

мером фармакопрепаратов с избирательной рецепторной активностью может служить блокатор постсинаптических α-адренорецепторов празозин, который может быть использован для лечения заболеваний, связанных с избыточной активностью адренергической системы.

Для перечисленных рецепторов получено большое количество избирательных агонистов и антагонистов, часть из которых нашла широкое применение в последние годы. Причём не для всех рецепторов известны эндогенные лиганды (бензодиазепиновые рецепторы являются мишенью действия транквилизаторов; имипраминовые рецепторы трициклических антидепрессантов).

Очевидно, что клиническим фармакологам, применяющим те или иные лекарственные средства, следует всегда помнить о динамической природе рецепторных образований. Число рецепторов одного типа, соотношение между типами и подтипами, сопряжение рецепторов с определяющими их функциональную активность ферментами, ионными каналами и другими регуляторными структурами в клетках могут меняться в процессе дифференцировки ткани, а также при изменении гормонального фона и воздействии различных физиологических и патологических факторов.

Избирательность эффектов ЛВ обеспечивается специфичностью рецепторов, которые в основном локализованы на плазматической мембране, а также специфичностью отдельных этапов реализации активирования рецепторов и, в частности, особенностями протеинкиназ, имеющих узкую субстратную специфичность. Вторичные посредники, активируя различные протеинкиназы, обеспечивают формирование селективного эффекта в определённых типах клеток.

Одна клетка может одновременно содержать множество рецепторов и несколько сигнальных систем вторичных посредников, которые могут при одновременном функционировании действовать в одном или противоположном направлении.

Рассмотрение рецепторных механизмов действия ЛВ будет неполным, если не сказать о том, что они подвержены регуляторным воздействиям. К наиболее важным из них относятся даун-регуляция (снижение количества рецепторов на поверхности клетки при повышенной концентрации лиганда) и десенсетизация (изменение конформации или структуры рецептора вследствие фосфорилирования, индуцируемого лигандом). Десенсетизация обычно исчезает в течение миллисекунд или секунд после диссоциации комплекса лиганд–рецептор, а даун-регуляция может длиться дольше.

В настоящее время создана база данных по рецепторам для ЛВ. Все белки, выполняющие в организме человека функцию рецепторов, описаны и специальным образом пронумерованы. Название каждого рецептора начинается с букв «RC», за которыми следует буквенно-цифровой код. Первая цифра, например, обозначает принадлежность рецептора к одному из четырёх классов: рецепторы, связанные с G-белками; рецепторы входящие в состав ионных каналов; рецепторы, содержащие фрагмент с тирозинкиназной активностью; рецепторы, регулирующие транскрипцию (ядерные рецепторы). Перед учёными стоит задача выявить и описать все рецепторы, кодируемых человеческим геномом. Согласно данным международного общества фармакологов к первому классу относится около 700 рецепторов, а к четвёртому — 48 (есть мнения, что число ядерных рецепторов может достигать 200).

Современный этап развития рецепторной теории на практике привёл к использованию молекулярных мишеней для направленного транспорта ЛС с помощью антител или гормонов как векторов для других активных молекул. Новые технологии на основе генной инженерии позволяют включать в геном клетки гены необходимых рецепторов и таким образом изменять в нужном направлении чувствительность клеток.

Становление и развитие молекулярной фармакологии в последние десятилетия привели к реализации возможности направленного поиска новых ЛС на основании

данных о пространственной структуре активных центров рецепторов и синтеза комплементарных химических соединений, в том числе с помощью компьютерного моделирования.

Развитие геномики и протеомики привело к систематизации всех возможных рецепторных макромолекул и выявлению огромного количества мишеней для регуляторного воздействия ЛВ. Однако наличие у любой активной субстанции особенностей фармакокинетики (в частности, биотрансформации, приводящей к усилению фармакологической активности, или, наоборот, к появлению высокотоксичных метаболитов), а также возможности побочного действия (менее специфичного взаимодействия с иными биоструктурами, а не только со специфичными рецепторами) или наличия у неё неспецифических свойств (например, антиоксидантных или прооксидантных, значительно меняющих общую фармакологическую активность) делает необходимым, как и прежде, проведение всего комплекса доклинических и клинических испытаний новых соединений — потенциальных лекарственных средств.

Рассматривая теоретические вопросы будущего развития рецепторологии, следует указать на нерешённые проблемы выяснения молекулярных и субмолекулярных механизмов функционирования рецепторных образований с обязательным участием молекул воды и синглетного кислорода, на необходимость исследования характера конформационных изменений в макромолекулах как основы передачи химического сигнала, а также роли в этих процессах слабых и сверхслабых взаимодействий и электромагнитных излучений, свойственных живой природе.

1.5. Рецепторы — ферменты

Мишенями действия ЛВ могут быть не только ферменты плазматических мембран, выполняющие трансдукторную функцию, но и любые другие энзимы. Поскольку ферменты катализируют биосинтез продуктов (метаболитов) из субстратов, фармакологические эффекты активаторов ферментов опосредованы увеличением синтеза продуктов реакции.

Некоторые ЛВ, связываясь с ферментами, увеличивают их ферментативную активность. Примером могут служить активаторы гуанилатциклазы для лечения стенокардии (нитроглицерин, динитрата изосорбид) или реактиваторы холинэстеразы, применяющиеся при отравлении нервными газами или фосфорорганическими инсектицидами (пралидоксим). Если количество ЛВ, активирующих ферменты, не так велико, то ингибиторов ферментов, применяемых в качестве ЛВ, достаточно много. Такие ЛВ, связываясь с ферментами, ингибируют их. Их эффекты опосредованы отсутствием образования продукта реакции (метаболита). Ингибиторы циклооксигеназы применяют для уменьшения боли, в частности при артритах (аспирин, ибупрофен). Ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглютарил-коэнзим А (ГМГ-Коа)-редуктазы применяют при гиперхолестеринемии (аторвастатин, правастатин). Игибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) применяют при повышенном артериальном давлении, сердечной недостаточности и хронической почечной недостаточности (каптоприл, рамиприл); ингибиторы фосфодиэстразы типа 5 — для лечения эректильной дисфункции (варденафил).

1.6. Рецепторы — мембранные транспортёры

Специальными мишенями ЛВ являются мембранные транспортёры, которые связывают и переносят через мембрану молекулу. Некоторые ЛВ, связываясь с транспортёром, вызывают по аллостерическому механизму изменение функционирования

транспортёра. Эффекты ингибиторов транспортёров опосредованы изменением внутриклеточной или внеклеточной концентрации специфических молекул.

Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина применяют для лечения депрессии (флуоксетин — Прозак, флувоксамин). Ингибиторы (Na-2Cl-K)-транспортёра эпителиальных клеток почек применяют для увеличения выделения мочи и натрия при лечении отёков (фуросемид — Лазикс, буметадин) [13].

1.7. Классификация взаимодействий лекарственное вещество — рецептор

В зависимости от того, активируют или блокируют ЛВ рецепторы, выделяют три класса ЛВ.

1. Агонисты ЛВ, вызывающие характерный фармакомиметический ответ при связывании с рецептором и по своему действию сходные с действием эндогенных медиаторов. Большинство агонистов ЛВ присоединяются к связывающему агонистическому участку, стимулируя развитие эффекта. Некоторые агонисты ЛВ могут связываться с аллостерическим участком рецептора, увеличивая способность эндогенного агониста связываться с рецептором и стимулировать его. Примером агонистов могут быть лиганды α_1-адренорецепторов для лечения ринита (оксиметазолин, фенилэфрин) или лиганды опиоидных рецепторов для анальгезии (морфин, меперидин).

2. Антагонисты ЛВ, ингибирующие действие эндогенных медиаторов благодаря блокированию их связывания с рецепторами. Наиболее изучены антагонисты, которые взаимодействуют с рецепторами вегетативной нервной системы. Большинство антагонистов присоединяется к связывающему участку рецептора и стерически предотвращает связывание эндогенного агониста. Однако антагонисты могут связываться с аллостерическими участками, что также может приводить к вытеснению эндогенного агониста из его связи с рецептором. При связывании молекул антагонистов с рецепторами эндогенные лиганды не могут связываться с рецептором и вызывать физиологический эффект.

Многие антагонисты рецепторов представляют собой ЛВ, имеющие важное клиническое значение. К блокаторам ангиотензиновых рецепторов, эффективных при лечении повышенного артериального давления, сердечной недостаточности, хронической почечной недостаточности, относятся лозартан и валзартан. Блокаторы β-адренорецепторов применяют при лечении стенокардии, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, повышенного артериального давления, при профилактике мигрени (пропранолол, атенолол).

3. Частичные агонисты ЛВ, имеющие более низкую эффективность, чем агонисты, т. е. вызывающие меньший эффект при связывании с рецепторами.

1.8. Кинетика взаимодействия лекарственное вещество — рецептор

Используя математическое описание взаимодействия ЛВ с рецепторами, можно графически показать существующие различия в данных взаимодействиях. Обычно в интактных биологических системах постепенное увеличение концентрации ЛВ приводит к уменьшению приращения величины эффекта. В идеальном случае описание зависимости между эффектом и концентрацией ЛВ аналогично описанию

ферментативной кинетики и подчиняется закону действия масс:

$$E = E_{max} \frac{C}{C + EC_{50}},$$

где E — эффект ЛВ, наблюдаемый при его концентрации C; E_{max} — максимальный эффект, который может быть вызван ЛВ, а EC_{50} — концентрация ЛВ, при которой наблюдается половина (50%) эффекта от максимального.

С помощью радиоактивных лигандов можно найти величину сродства ЛВ к рецептору, т. е. равновесную константу диссоциации — $K_д$, согласно уравнению:

$$B = B_{max} \frac{C}{C + K_д},$$

где B_{max} — общая концентрация рецепторов. Если $K_д$ мала, то сродство ЛВ к рецептору велико, и наоборот.

Если откладывать по оси абсцисс дозу ЛВ, а по оси ординат величину эффекта ЛВ или процент от величины максимального эффекта, то зависимость эффекта ЛВ от дозы имеет вид гиперболы (см. рис. 1.1).

Проведение такого количественного и графического анализа позволяет сравнить действие различных агонистов и антагонистов. Два агониста могут вызывать одинаковый максимальный эффект, т. е. быть равноэффективными, но отличаться по силе действия; агонист А, вызывающий максимальный эффект в более низкой концентрации, является более сложным ЛВ, по сравнению с агонистом В, который такой же эффект может вызвать только в более высокой концентрации.

Антагонист S, действующий по обратимому конкурентному механизму, сдвигает кривую концентрация–эффект вправо.

Частичный агонист Р снижает величину максимального эффекта, а антагонист R, действующий по необратимому или неконкурентному механизму, сдвигает кривую вправо и уменьшает величину максимального эффекта ЛВ.

Величина и продолжительность фармакологического эффекта обратимых антагонистов зависит от их концентрации, а необратимых антагонистов не только от концентрации, но и от времени жизни модифицированных рецепторов.

Описанные зависимости концентрация–эффект свидетельствуют о важнейшей роли количества ЛВ в месте его действия в формировании фармакологического ответа организма. Поэтому процессы, определяющие уровень ЛВ в организме, всегда находятся в поле зрения фармаколога и относятся к специальной части фармакологии — фармакокинетике.

1.9. Нерецепторные механизмы действия лекарственных веществ

Эффекты ряда ЛВ — неспецифический результат их физических или химических свойств. В некоторых случаях ЛВ могут разрушать структурные белки (например, алкалоиды барвинка для лечения рака: винкристин, винбластин). В других случаях ЛВ, ковалентно связываясь с макромолекулами, например алкилируя ДНК, также оказывают цитотоксическое действие, полезное при онкологических заболеваниях (циклофосфамид, хлорамбуцил).

Некоторые ЛВ могут вступать в химические реакции с малыми молекулами. Антациды, нейтрализующие кислотность желудочного сока (различные препараты, содержащие $Al(OH)_3$, $Mg(OH)_2$ или $CaCO_3$), широко применяют для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Некоторые ЛВ взаимодействуют химическим путём с молекулами или ионами, например хелатные соединения. Динатриевая соль ЭДТА комплексно связывает ионы Ca^{2+} в крови и тканях организма

и облегчает их выведение из организма. Для других ЛВ оказалась полезной способность связывать свободные молекулы или атомы (секверстанты жёлчных кислот для лечения гиперхолестеринемии: холестирамин; хелаторы для лечения отравлений тяжёлыми металлами: димеркапрол, пеницилламин; белки, связывающие провоспалительный цитокин — фактор некроза опухолей-α, применяемые для лечения ревматоидного артрита: инфликсимаб, этанерсепт). ЛВ с антисмысловым механизмом действия (дезоксиолигонуклеотиды, комплементарные к определённым нуклеотидным последовательностям нуклеиновых кислот) оказались эффективными для лечения цитомегаловирусного ретинина у пациентов со СПИДом (фомивирсен).

Действие определённых ЛВ обусловлено их физическими свойствами. Например, объёмные лаксативы (псиллиум, поликарбофил) можно использовать для лечения запоров, а осмотические диуретики (маннитол) для лечения отёков. После поступления в кровь осмотические диуретики фильтруются через почечные клубочки и увеличивают осмотическое давление тубулярной мочи. Следовательно, вода должна реабсорбироваться против более высокого, чем обычно, осмотического градиента, ввиду чего реабсорбция протекает медленнее и ведёт к диуретическому эффекту. Такой же принцип лежит в основе действия кровезаменителей, осмотически активные макромолекулы которых, оставаясь в сосудистом русле, задерживают в кровеносной системе воду. Дезинфицирующие и антисептические средства оказывают неспецифический деструктивный эффект на живые клетки, нарушая целостность мембран, денатурируя белки и т. д. Средства для ингаляционного наркоза растворяются в липопротеинах мембран нейронов, оказывая стабилизирующее действие.

Некоторые ЛВ представляют собой ферменты. Пример — фермент альтеплаза для тромболитической терапии при остром инфаркте миокарда.

Таким образом, знание фармакодинамики, объективный и всесторонний анализ явлений, происходящих в организме больного под влиянием ЛВ, позволяет врачу осуществлять адекватный выбор наиболее эффективного и безопасного препарата или их комбинации, научно обосновывать индивидуальный режим дозирования и способа введения лекарственного средства в конкретной клинической обстановке, прогнозировать и выявлять на ранних этапах побочные эффекты и своевременно проводить их коррекцию.

1.10. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ: закономерности и возможные механизмы

Впервые врачевание малыми дозами было предложено в 1790 г. Самуилом Ганеманом. Он же предложил принцип «*similia similibus curantur*» — «подобное лечится подобным», благодаря которому его метод получил названия гомеопатии (греч. *homoios* — подобный, *pathos* — страдание). В начале XX в. немецкий писатель Якоб Вассерман так пишет об этом методе:

Разумный врач с природою святой
Подобное подобным исцеляют:
Жар жаром, а кислотность кислотой
И малой дозой много достигают.

Перевод Н. Ман

С развитием медицины и фармакологии в XX в., казалось бы, канула в прошлое гомеопатическая школа. Невоспроизводимость результатов, нестабильность эффектов лечения, невозможность их объяснения с научной точки зрения — вот основные недостатки гомеопатии. Однако в последние годы стал наблюдаться возрастающий интерес исследователей к действию сверхмалых доз биологически активных веществ.

Данные эффекты описаны для разнообразных групп биологически активных веществ: гормонов, эндогенных регуляторных пептидов, антител, некоторых других веществ.

При этом следует отметить, что общепринятого определения сверхмалых доз нет — и различные авторы указывают разные цифры. Зачастую никаких обоснований авторами не приводится; кроме того, многие авторы путают понятия «доза» и «концентрация». В частности, под сверхмалыми дозами понимаются концентрации бруфена, более низкие, чем описанные ранее в литературе (10^{-10}–10^{-14} М). Под сверхмалыми дозами понимаются концентрации биологически активных веществ ниже 10^{-12} М, при этом никаких обоснований для такого определения сверхмалых доз не приводится. По определению [8] сверхмалыми дозами считаются концентрации в диапазоне 10^{-18}–10^{-14} М, так как при этом наблюдается связывание единичных молекул лиганда с рецепторами.

С нашей точки зрения, правильней понимать под сверхмалыми дозами дозы, которые обеспечивают концентрацию ЛВ в месте действия на несколько порядков ниже константы диссоциации ЛВ с рецептором: менее 10^{-11}–10^{-14} М, обычно константа диссоциации составляет порядка 10^{-9}–10^{-12} М [4, 5]. Расчётные концентрации действующих веществ в этих работах составляют 10^{-24}–10^{-29} М (или примерно 1 молекула на 10 л для концентрации 10^{-24} М и примерно 1 молекула на 10^6 л (10^3 м^3) для концентрации 10^{-29} М). Однако необходимо оговориться, что при концентрациях ниже 10^{-20} М вероятность нахождения хотя бы одной молекулы ЛВ в 1 мл жидкости близка к нулю, поэтому для объяснения подобных эффектов авторы используют такие понятия, как «активированная вода», «память молекул», «биоактивация», которые пока трудно объяснить с помощью современного уровня знаний в области физико-химической биологии. Мы считаем, что этому может помочь создание теории информационного поля.

Если сверхмалые дозы оказывают достоверное воздействие на биологический объект, то они являются действующими дозами. Если сверхмалые дозы на биологические объекты не влияют, то их изучение не имеет смысла. Поэтому выделение сверхмалых доз необходимо только по отношению к взаимодействию лигандов с рецепторами: если взаимодействуют единичные молекулы лиганда с рецепторами, то лиганд-рецепторное взаимодействие носит вероятностный характер и наблюдаются случайные флуктуации количеств связанного с рецепторами лиганда (данный вопрос подробней рассматривается ниже). Важная проблема здесь — использование адекватного метода, позволяющего зарегистрировать наличие биологического эффекта на уровне одного атома или молекулы. Используемые методы в физиологической фармакологии позволяют оценивать эффекты физиологически активных веществ лишь на уровне клеток, а для этого в клетках необходимо наличие специальных систем усиления и времени, достаточного для проявления полученного молекулярного сигнала.

Действительно, доказано, что биологические эффекты могут вызываться единичными молекулами. Показано сохранение биологических эффектов ферромона при разбавлении до 36 молекул в 1 мкл.

Поэтому исследование действия сверхмалых доз веществ представляет значительный интерес, так как может привести к созданию новых ЛВ или к описанию новых, существенно важных свойств уже известных ЛВ. Кроме того, изучение действия сверхмалых доз биологически активных веществ может помочь объяснить эффекты ряда гомеопатических препаратов.

1.10.1. Закономерности действия сверхмалых доз. При анализе данных литературы, посвящённых действию сверхмалых доз, обращает на себя внимание во многих случаях отсутствие эффектов в области концентраций 10^{-12}–10^{-8} М (так на-

зываемая мёртвая зона). Традиционно, изучая действие различных ЛВ, фармакологи не находили их эффектов при достаточно низких концентрациях и считали, что при ещё более низких концентрациях эффектов заведомо не будет. Однако, используя правильные методические подходы при проведении исследований, удалось показать обратное: при действии сверхмалых доз могут наблюдаться достоверные эффекты в биологических объектах; при этом данные эффекты могут отличаться от обнаруженных при действии бóльших доз, а могут совпадать с ними. Такие результаты были получены благодаря тому, что эффекты ЛВ изучали во всём диапазоне концентраций: от атомарных до молярных. Отсутствие эффекта при достижении достаточно больших (или достаточно низких) концентраций не означает его отсутствия при действии ещё бóльших (или меньших) концентраций.

Установлено, что бруфен в концентрации от 10^{-14} до 10^{-10} М оказывает стимулирующее воздействие на высвобождение метаболитов арахидоновой кислоты перитонеальными макрофагами мыши, в диапазоне от 10^{-10} до 10^{-7} М не влияет на их высвобождение и в диапазоне 10^{-7}–10^{-4} М угнетает его (рис. 1.4).

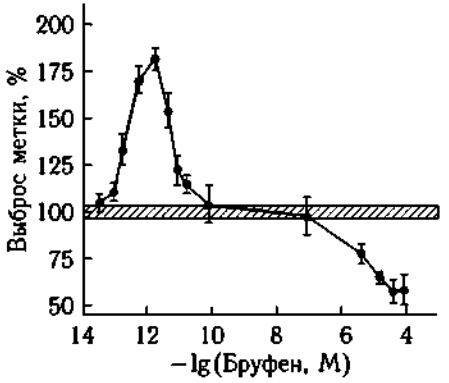


Рис. 1.4. Влияние бруфена в широком диапазоне концентраций на высвобождение [^{3}H]-метаболитов арахидоновой кислоты перитонеальными макрофагами мыши. За 100% принят выброс метки в отсутствии бруфена

Можно предположить, что стимуляция высвобождения метаболитов арахидоновой кислоты при действии сверхмалых доз бруфена наблюдается из-за того, что данный препарат взаимодействует с липидами клеточных мембран, изменяя их конформацию. При увеличении концентрации бруфена он проникает в клетку и взаимодействует с циклоксигеназой, ключевым ферментом метаболизма арахидоновой кислоты. При этом, как известно из литературы [5], бруфен — быстрый обратимый ингибитор этого фермента.

Для других веществ было показано, что эффекты сверхмалых доз примерно совпадают по силе и величине с наблюдаемыми при действии бóльших доз. При этом кривая доза–эффект будет иметь бимодальный характер.

Основной трудностью при изучении эффектов сверхмалых доз является их нестабильность. Некоторые эксперименты оказываются невоспроизводимыми, и в одних и тех же условиях эффекты сверхмалых доз могут различаться не только по силе, но и по знаку (рис. 1.5). Это даёт основание многим авторам сомневаться в достоверности эффектов сверхмалых доз биологически активных веществ.

В доступной литературе до сих пор нет теории, которая бы полностью объясняла все эффекты действия сверхмалых доз биологически активных веществ. Наблюдае-

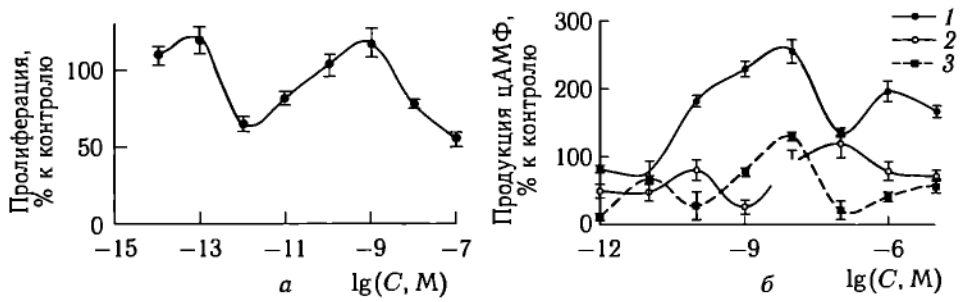


Рис. 1.5. Бимодальные зависимости доза–эффект: *а* — влияние простагландина E_2 на пролиферацию лимфоцитов селезёнки мыши; *б* — влияние лигандов опиоидных рецепторов на продукцию цАМФ лимфоцитами крови человека; *1* — DADLE; *2* — даларгин; *3* — метэнкефалин

мые эффекты пытаются объяснять при помощи следующих гипотез: концентрирование ЛВ, наличие высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала, «адаптации» рецепторов к действию сверхмалых доз, существование супервысокоаффинных рецепторов. Не исключена также возможность рефлекторного действия ЛВ с места его аппликации (например, в результате возбуждения определённых рецепторов желудочно-кишечного тракта).

1.10.2. Молекулярные механизмы действия сверхмалых доз лекарственных веществ. С нашей точки зрения, имеющиеся современные данные о рецепторных механизмах действия ЛВ позволяют считать, что наиболее вероятным объяснением эффектов сверхмалых доз биологически активных веществ представляется существование высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала. Действительно, один сопряжённый с G-белком рецептор, находясь в активном состоянии, может взаимодействовать с 10–100 G-белками. G-белок способен проактивировать 10–100 аденилатциклаз. Одна активная аденилатциклаза способна катализировать образование до 1000 молекул цАМФ. Тем самым рецепторный сигнал может быть усилен в 10^6–10^{10} раз [1, 4, 5]. Заметим, что ещё более мощные системы усиления сигнала наблюдаются для другого внутриклеточного мессенджера, ионов кальция [1]. Существование столь мощных систем проведения и усиления рецепторного сигнала способно объяснить действие сверхмалых доз биологически активных веществ.

Таким образом, биологический ответ может быть получен при оккупации незначительной части рецепторов. Данное предположение перекликается с «классической» теорией «свободных рецепторов» Стефенсона, согласно которой максимальный эффект агонистов наблюдается при оккупации части рецепторов. Тем самым рассуждения, приведённые выше, дают обоснование теории Стефенсона исходя из современных представлений о молекулярных механизмах проведения и усиления рецепторного сигнала.

1.10.3. Объяснение нестабильности эффектов сверхмалых доз. Основная проблема, возникающая при изучении закономерностей действия сверхмалых доз биологически активных веществ и требующая своего объяснения, — нестабильность эффектов, невоспроизводимость результатов экспериментов со сверхмалыми дозами. По нашему мнению, их можно объяснить исходя из следующих представлений.

Эффекты сверхмалых доз индуцируются связыванием единичных молекул лигандов с клеточными рецепторами. В этих условиях понятие «концентрация» лишено

физического смысла, так как речь идёт о случайном распределении единичных молекул в некотором объёме.

Кроме того, в условиях связывания единичных молекул лиганда с рецепторами лиганд-рецепторное взаимодействие описывается законом редких событий (Пуассона) с математическим ожиданием N (число лиганд-рецепторных комплексов) и среднеквадратичным отклонением $\sqrt{N}$ [5]. Это означает, что наблюдаются случайные флуктуации числа связанных с рецепторами лигандов порядка $1/\sqrt{N}$.

Аналогичные флуктуации числа лиганд-рецепторных комплексов при действии сверхмалых доз были получены во многих экспериментах. При увеличении числа лиганд-рецепторных комплексов величина $1/\sqrt{N}$ убывает, и при $N \geqslant 10000$ лиганд-рецепторное взаимодействие может быть описано исходя из закона действующих масс (так как дисперсия числа лиганд-рецепторных комплексов становится мала по сравнению с их математическим ожиданием).

По всей видимости, случайные флуктуации порядка $1/\sqrt{N}$ наблюдаются не только для системы лиганд–рецептор, но и для систем проведения и усиления рецепторного сигнала, что приводит к увеличению величины случайных флуктуаций. Например, если предположить, что в среднем связывается 10 лигандов с клеточными рецепторами, то число лиганд-рецепторных комплексов будет флуктуировать от 7 до 13. Если при этом каждый лиганд-рецепторный комплекс взаимодействует в среднем с 10 G-белками, то число активных G-белков будет флуктуировать от 49 до 169. Если каждый G-белок активирует в среднем 10 аденилатциклаз, то число аденилатциклаз будет флуктуировать от 343 до 2197. Если каждая аденилатциклаза синтезирует в среднем 100 молекул цАМФ, то число синтезированных молекул цАМФ будет флуктуировать от 30,9 тыс. до 241,7 тыс., т. е. измеряемая в одном и том же эксперименте концентрация цАМФ может отличаться примерно в 6 раз за счёт случайных флуктуаций.

Таким образом, приведённые рассуждения свидетельствуют о том, что в области сверхмалых концентраций ЛВ значительно увеличивается вероятность большого разброса получаемых результатов, который можно объяснить с помощью вероятностных представлений о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия.

1.10.4. Механизм формирования «мёртвой зоны». Одна из необъяснённых закономерностей эффектов действия сверхмалых доз — отсутствие биологического ответа в области 10^{-12}–10^{-8} М [9], наблюдаемое практически во всех экспериментальных работах. При этом чаще всего кривые доза–эффект имеют полимодальный характер (рис. 1.6).

С нашей точки зрения, объяснение этому феномену может быть дано исходя из предположения о существовании систем с отрицательной обратной связью, например с субстратным торможением. На кривых доза–эффект для таких систем наблюдается максимум (рис. 1.6, *а*) с максимальным синтезом субстрата $[S]_{max}$. Субстрат S может вступать в процесс ферментативных превращений. При этом если кинетическая схема ферментативного превращения описывается как субстратное угнетение

$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow P, \qquad ES + S \rightleftarrows ES_2, \tag{4}$$

то на кривой доза–эффект будет максимум (рис. 1.6, *б*). В уравнении (4) E — фермент, ES, ES_2 — активные и неактивные фермент-субстратные комплексы, P — продукт.

Пусть максимальный синтез продукта, $[P]_{max}$, наблюдается при концентрации субстрата $[S]_1$. Если точка максимума кривой доза–эффект схемы (2) приходится на возрастающий участок ($[S]_1 < [S]_{max}$), то суммарная кривая доза–эффект будет иметь полимодальный характер (рис. 1.6, *в*).

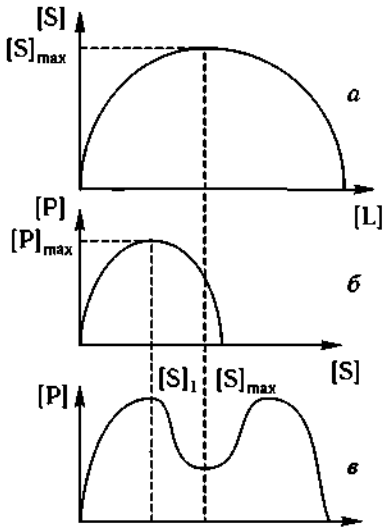


Рис. 1.6. Возможное объяснение формирования полимодальной зависимости доза–эффект (комментарии в тексте)

Если синтез субстрата S подчиняется зависимости, представленной на рис. 1.6, *а*, то исходя из уравнений кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия [2] в условиях равновесия количество субстрата определяется по формуле

$$[S] = \alpha \frac{[R]_{01}[L]}{[L] + K_{д1}} - \beta \frac{[R]_{02}[L]}{[L] + K_{д2}}, \tag{5}$$

где $[R]_{0i}$ — начальные концентрации рецепторов, [L] — концентрация лиганда ($[L] > [R]_{0i}$), $K_{дi}$ — константы диссоциации лигандов с рецепторами, α, β — коэффициенты, учитывающие вклад каждого из рецепторов в активацию или угнетение синтеза субстрата.

«Мёртвой» зоне на суммарной кривой доза–эффект (рис. 1.6, *в*) соответствует точка максимума на кривой доза–эффект для уравнения (3) (рис. 1.6, *а*), которая наблюдается при концентрации лиганда, удовлетворяющей тождеству:

$$\alpha[R]_{01}K_{д1}([L] + K_{д2})^2 = \beta[R]_{02}K_{д2}([L] + K_{д1})^2. \tag{6}$$

Если $\alpha \approx \beta$, $[R]_{01} \approx [R]_{02}$, $K_{д1} \approx K_{д2}$, то при концентрации лиганда

$$[L] \approx \sqrt{K_{д1}K_{д2}} \tag{7}$$

наблюдается максимальный синтез субстрата $[S]_{max}$.

Так как «мёртвая» зона находится в диапазоне концентраций 10^{-8}–10^{-12} М, то, как следует из проведённых рассуждений и условия (5), константы диссоциации лигандов с рецепторами должны иметь порядок 10^{-8}–10^{-12} М, что действительно наблюдается для реальных рецепторных систем [5].

1.10.5. Развитие эффектов сверхмалых доз во времени. Системы с обратной связью могут позволить получить ещё одно очень интересное следствие. Пусть синтез субстрата S определяется схемой (1) и формулой (3) при $\alpha = \beta$, а концентрация лиганда изменяется в соответствии с кинетикой однокамерной фармакокинетической модели [2]:

$$[L] = \frac{m_{эфф}}{V}\left(e^{-k_{эл}t} - e^{-k_1 t}\right), \tag{8}$$

где $m_{эфф}$ — эффективная доза ЛВ (поступающая в камеру), V — объём камеры, $k_{эл}$ — константа элиминации, k_1 — константа скорости поступления лекарственного вещества в камеру.

Исходя из изложенных предположений могут наблюдаться моно- или бимодальные зависимости доза–эффект (рис. 1.7), причём число мод (максимумов на кривой)

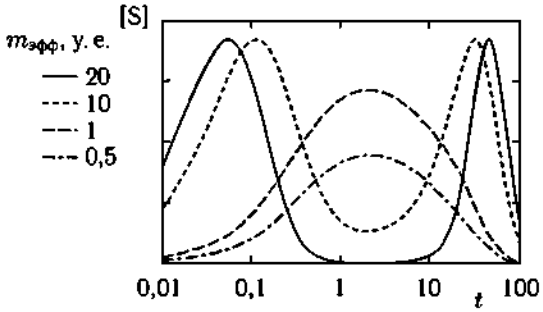


Рис. 1.7. Развитие дозозависимых эффектов с течением времени: $k_{эл} = 1$, $k_1 = 2$

определяется эффективной дозой введённого ЛВ. Характерно, что наблюдается смещение по времени максимума синтеза субстрата на бифазной кривой доза–эффект, которое зависит от эффективной дозы. Поэтому в фармакологическом эксперименте необходима регистрация биологических эффектов в максимально возможном временном диапазоне: отсутствие снижение эффекта к моменту времени t_1 и его отсутствие в момент времени $t_1 + \delta$ ($\delta > 0$) не означает отсутствие эффекта в момент времени t_2 ($t_2 > t_1 + \delta$).

Если часть лиганда связывается с белком-переносчиком, то

$$[L]_{эфф} = \delta \frac{m_{эфф}}{V} \left(e^{-\gamma k_{эл} t} - e^{-k_1 t}\right),$$

где $[L]_{эфф}$ — взаимодействующая с рецепторами часть лиганда (эффективная концентрация лиганда); δ — доля свободного лиганда, γ — коэффициент, учитывающий элиминацию только свободного или только связанного с белком-переносчиком лиганда.

В настоящее время следует считать доказанным, что ЛВ могут быть активными в сверхнизких дозах, причём эти эффекты по своей направленности могут отличаться от тех, которые обычно имеют место при действии ЛВ в терапевтических дозах. Для объяснения эффектов сверхмалых доз нет необходимости вводить понятия супервысокоаффинных рецепторов или «адаптации» рецепторов, тем более что наличие супервысокоаффинных рецепторов и процессов рецепторной «адаптации» не доказано. Эффекты сверхмалых доз, в том числе полимодальные, могут быть объяснены исходя из представлений о существовании высокоэффективных систем проведения и усиления рецепторного сигнала с отрицательной обратной связью в одной или нескольких каскадных реакциях. В дальнейшем мы ожидаем появления новых экспериментальных данных, которые помогут лучше понять теоретические аспекты действия ЛВ в диапазоне концентраций, которые находятся ниже значений равновесных констант ассоциации ЛВ с рецепторами. Для этого следует стремиться получить наиболее полную информацию о всех эффектах ЛВ в максимально возможном диапазоне концентраций и времён.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 1

1. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж.* Молекулярная биология клетки. М: Мир, 1994. Т. 2. С. 93–253.
2. *Алмазов В.А., Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Леонтьев Н.В.* Клиническая патофизиология. — М.: ВУНМНЦ, 1999. — 464 с.
3. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — 720 с.
4. *Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В.* Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М.: Из-во МГУ, 1982. — 345 с.
5. *Гуревич К.Г.* Классификация и фармакокинетический анализ зависимостей доза–эффект // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2001. № 2. С. 9–14.
6. *Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д.* Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. — М.: Из-во МГУ, 1993. — 255 с.
7. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний / Под ред. Е.И. Чазова, Ю.Н. Беленкова. — М.: Литтерра, 2004. — 972 с.
8. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. — 384 с.
9. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Гуревич К.Г., Ухина Т.В.* Механизмы формирования различных зависимостей доза–эффект для эстрогенов // Химико-фармацевтический журнал. 35. № 9. С. 6–7.
10. *Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В.* Небиволол — суперселективный b-адреноблокатор и индуктор синтеза NO в эндотелии сосудов // Кардиология. 2001. Т. 41, № 7. С. 96–103.
11. *Харкевич Д.А.* Фармакология. М: ГЭОТАРМЕД, 2004. — 736 с.
12. *Barnard R., Wolff R.* Analysis and application of an equilibrium model for *in vitro* bioassay systems with three components: receptor, hormone and hormone-binding-protein // J. Theor. Biol. 1998. V. 190. P. 333–339.
13. *Bratter D.C., Chennavasin P., Dehmer G.J.* Prolonged hemodynamic effect of furosemide in congestive heart failure // Am. Heart J. 1984. V. 108. P. 1031–1032.
14. *Breckenridge A.M.* Decision-making in the development of new drugs // J. Hypertens. Suppl. 1985. V. 3. P. S51–S55.
15. *Jelliffe R.W., Maire P., Sattler F. et al.* Adaptive control of drug dosage regimens: basic foundations, relevant issues, and clinical examples // Int. J. Biomed. Comput. 1994. V. 36. P. 1–23.
16. *Veldhuis J.D., Johnson M.L., Faunt L.M. et al.* Influence of the high-affinity growth hormone (GH)-binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH. Modeling analysis and clinical applications // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 629–641.
17. *Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marban E.* Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection // Circulation res. 2001. V. 9, № 89(10). P. 891–898.
18. *Xu M., Wang Y., Hirai K., Ayub A.* et. al. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis // American journal heart circulation physiology. 2001. № 280. P. 899–908.
19. *Camehn R., Rehse K.* New NO donors with antithrombotic and vasodilating activities, Part 29. N-(1-cyanocyclohexyl)-C-phenylnitrones and glyoxaldinitrones // Arch. Pharm. (Weinheim). 2000. V. 333, № 5. P. 130–4.
20. *Heck D.E.* $N^{\bullet}O$, RSNO, $ONOO^{-}$, NO^{+}, $N^{\bullet}OO$, NOx-dynamic regulation of oxidant scavenging, nitric oxide stores, and cyclic GMP-independent cell signaling // Antioxid Redox Signal. 2001. V. 3, № 2. P. 249–60.
21. *Mu J., Brozinick J.T., Valladares O.* A role for AMP-activated protein kinase in contraction and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle // Mol. Cell. 2001. V. 7, № 5. P. 1085–94.

Глава 2
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Фармакокинетика (от греч. *pharmacon* — лекарство, *kineo* — двигать) изучает поступление, всасывание (абсорбцию), транспорт системой крови, распределение, превращение (биотрансформацию) лекарственных веществ (ЛВ), их выделение (экскрецию, элиминацию) из организма и зависимость от этих процессов эффективности и переносимости препаратов. Другими словами, предметом её изучения являются закономерности изменения концентрации лекарственных веществ и их метаболитов в средах организма с течением времени. Фармакокинетика относится к одному из основополагающих разделов современной фармакологии.

Основная цель фармакокинетики заключается в оптимизации дозирования ЛВ с целью улучшения терапевтического эффекта и уменьшения токсического. Прикладная задача фармакокинетики состоит в выявлении связей между концентрациями лекарственного вещества и его метаболитов в различных средах организма и фармакологическим эффектом. Основной экспериментальный метод фармакокинетики — изучение индивидуальных особенностей изменения концентрации ЛВ с течением времени, которые в первую очередь зависят от скорости поступления ЛВ из места введения в кровь, характера биотранспорта и эффективности систем элиминации (выведения и метаболизма) ЛВ.

2.1. Основные понятия фармакокинетики

Фармакокинетика использует ряд понятий и терминов, определение которых необходимо для понимания излагаемого материала.

Доза — количество ЛВ, введённого в организм. Выделяют разовую, суточную и курсовые дозы. Разовой дозой (*dosis pro disi*) называют количество вещества на один приём. Из однократных разовых доз складывается суточная доза (*dosis pro die*). В некоторых случаях указывается доза препарата на курс лечения — курсовая доза (*dosis pro cursu*). Это особенно важно при применении антимикробных средств.

В разовых дозах обычно назначают препараты для экстренного вмешательства в жизнедеятельность организма, действие таких лекарственных веществ обычно развивается достаточно быстро. В суточных дозах обычно назначают препараты, которые обладают кумулятивным (накопительным) эффектом. При этом суточная доза может быть разделена на несколько приёмов. В курсовых дозах обычно назначают препараты с отсроченным терапевтическим эффектом. Для некоторых препаратов такого типа эмпирически подобраны схемы введения, определяющие то количество ЛВ, которое необходимо ввести в тот или иной день проводимой терапии.

Для определения доз ЛВ, которые необходимо ввести в организм, обычно используют экспериментальный метод, определяя на подопытных животных эффекты, вызванные введением широкого диапазона доз. Определяют эффективную, токсическую и летальную дозы.

Под эффективной понимают дозу, вызывающую желаемый эффект. Под токсической понимают дозу, приводящую к развитию токсических осложнений. Под летальной понимают дозу, приводящую к гибели подопытных животных. Эти дозы принято обозначать как ED (*effective dose*), TD (*toxic dose*) и LD (*lethal dose*). Чаще всего определяют ED_1, ED_{50}, ED_{99}, TD_1, TD_{50}, TD_{99}, LD_1, LD_{50} и LD_{99}, т.е. дозы, вызвавшие эффект (например, гибель) у 1%, 50% и 99% исследуемых животных. Так, ED_1 характеризует минимальную дозу, способную оказывать терапевтический эффект, ED_{50} — дозу, вызывающую эффект у половины исследованных животных, ED_{99} характеризует дозу, вызывающую эффект практически у всех животных.

Следует заметить, что для одного и того же препарата эффективная доза может отличаться в зависимости от того, какой эффект является желаемым. Так, эффективная доза ацетилсалициловой кислоты в качестве антикоагулянта составляет 0,5–1 г в день (для взрослого человека). Эффективная доза этого же препарата как противоревматического средства составляет 5 г в день.

Отметим, что LD определяется только на животных. Для человека определены значения ED, и для ряда препаратов — значения TD. Чем больше интервал между ED_{50} и TD_{50}, тем более безопасным является применение данного препарата. Если $ED_{99} < TD_1$, то в терапевтических дозах препарат токсических эффектов не вызывает. Если $ED_1 \leqslant TD_1$, то даже в минимальной дозе применение данного препарата сопряжено с развитием токсических осложнений. Так, относительно безопасным считается применение нестероидных противовоспалительных препаратов, диуретиков, сердечных гликозидов и ряда других. Применение противоопухолевых препаратов, нейролептиков и других практически всегда сопряжено с риском развития токсических осложнений.

Эксперименты на животных не позволяют выявить все возможные терапевтические и побочные эффекты. Особенно это касается кумулятивных эффектов и эффектов пролонгированного применения препаратов. Также на животных трудно определить тератогенное (вызывающее аномалии развития плода) и мутагенное действия. Поэтому, после испытания новых лекарственных препаратов на животных, их испытывают на людях — и лишь затем разрешают для повсеместного применения.

К примеру, антипирин и бутадион выводятся из организма животных в 10–100 раз быстрее, чем из организма человека. Поэтому их анальгетический эффект на животных достигается лишь в токсических дозах. Следовательно, в настоящее время данные препараты не могли бы успешно пройти доклинические испытания на животных [2]. Также хочется отметить, что, по данным проф. В. А. Горькова, из всех препаратов, успешно прошедших доклинические испытания на животных, лишь 2% обнаруживают клиническую эффективность на людях [5].

В медицинской практике, как сказано выше, принято различать разовые, суточные, курсовые дозы. В свою очередь, разовые терапевтические дозы подразделяются на минимальные (пороговые), средние и высшие. Кроме того, для характеристики безопасности ЛВ используют понятие токсической дозы: минимальная, средняя смертельная (вызывающая гибель 50% экспериментальных животных), абсолютно смертельная (вызывающая гибель 100% экспериментальных животных) и др.

Дозы чаще всего выражают в граммах или долях грамма (высокоактивные ЛВ, например стероиды, дозируют в мг или мкг), а также в Единицах Действия (ЕД) — для ЛВ, активность которых не всегда точно зависит от их количества (например, препаратов белковой природы). Для более точной дозировки препаратов рассчитывают их количество на 1 кг массы тела (например, 1 мг/кг, 1 мкг/кг). В отдельных случаях предпочитают дозировать вещества исходя из площади поверхности тела (на 1 кв. м) либо из расчёта на каждый год жизни (в детской практике). Для веществ, вводимых ингаляционно (например, газообразных или летучих наркозных

средств), основное значение имеет их концентрация во вдыхаемой воздушной смеси (обозначается в об. %).

При изучении действия лекарственных препаратов на людей определяют минимальную терапевтическую и минимальную токсическую дозы. Минимальная терапевтическая доза (аналог ED_1) определяется минимальным количеством лекарственного препарата, которое необходимо ввести для получения терапевтического эффекта. Минимальная токсическая доза (аналог TD_1) определяется минимальным количеством ЛВ, при котором начинается развитие нежелательных, побочных или токсических явлений. Разница между минимальной токсической и минимальной терапевтической дозами называется терапевтическим диапазоном (широтой терапевтического действия лекарственного вещества). Чем шире терапевтический диапазон, тем меньше вероятность возникновения осложнений при применении данного ЛВ.

Чаще всего в практической медицине используют средние терапевтические дозы (*dosis therapeutica media*), в которых препараты оказывают оптимальное фармакотерапевтическое действие. Если при их назначении эффект недостаточно выражен, дозу повышают до высшей терапевтической (*dosis therapeutica maxima*), которая является разовой предельно допустимой (*dosis pro dosi maxima*). Кроме этого, выделяется высшая суточная доза (*dosis pro die maxima*). Для ядовитых (*Venena*, группа А) и сильнодействующих (*Heroica*, группа Б) препаратов высшие разовые и суточные дозы приведены в Государственной фармакопее и превышать их запрещено (за исключением особых случаев). В клинике высшие дозы используют сравнительно редко, так как при этом у некоторых больных возможны побочные и токсические явления. В тех случаях, когда рациональная фармакотерапия требует быстрого создания высокой концентрации ЛВ в организме, первая доза (ударная) превышает последующие (поддерживающие).

2.2. Пути введения лекарственных веществ

Минимальная терапевтическая и минимальная токсическая дозы ЛВ во многом определяются путём введения ЛВ в организм. Основные пути введения представлены на рис. 2.1.

Путь введения ЛВ во многом определяет его биотрансформацию и биодоступность. Биотрансформация — совокупность процессов превращения ЛВ и образования его метаболитов. Степень биодоступности определяется той частью введённого ЛВ, которая достигла эффекторных органов и тканей:

$$v = \frac{m_{эфф}}{m_{введ}} \cdot 100\,\%, \qquad (1)$$

где v — биодоступность, $m_{введ}$ — масса введённого ЛВ, $m_{эфф}$ — масса ЛВ, достигшего эффекторной ткани.

2.2.1. Энтеральные пути введения. При сублингвальном и суббукальном путях введения всасывание начинается довольно быстро, препараты оказывают общее действие, минуя печёночный барьер и не контактируя с ферментами и соляной кислотой пищеварительного тракта. Сублингвально назначают быстродействующие вещества с высокой активностью (нитроглицерин), доза которых невелика, а также те ЛВ, которые плохо всасываются или разрушаются в желудочно-кишечном тракте. Препарат следует держать под языком до полного рассасывания. Проглатывание его части со слюной снижает преимущества этого пути введения. При частом регулярном применении ЛВ сублингвально может возникнуть раздражение слизистой оболочки ротовой полости.



Рис. 2.1. Основные пути введения лекарственных веществ [10]

Пероральный путь введения представляет собой проглатывание ЛВ и дальнейшее его продвижение по пищевому каналу. Этот путь наиболее прост и удобен для больного, не требует стерильности. Однако лишь незначительная часть ЛВ начинает всасываться уже в желудке. Для большинства лекарств самой благоприятной для всасывания является слабощелочная среда тонкого кишечника, поэтому при пероральном введении фармакологический эффект проявляется только через 35–45 мин. Принятое внутрь ЛВ подвергается воздействию пищеварительных соков и может потерять свою активность (например, разрушение протеолитическими ферментами инсулина и других препаратов белковой природы). Для некоторых веществ небезразличными оказываются соляная кислота и щелочная среда кишечника. Кроме того, вещества, всосавшиеся из желудка и кишечника, попадают через систему воротной вены в печень, где начинают инактивироваться ферментами. Этот процесс получил название «эффект первичного прохождения». Именно поэтому, а не вследствие плохой абсорбции дозы некоторых препаратов (аминазин, наркотические анальгетики) при приёме внутрь должны быть значительно больше, чем при внутривенном введении. Биотрансформацию вещества при «первичном прохождении» через печень называют пресистемным метаболизмом. Интенсивность его зависит от скорости тока крови в печени. Для оценки пресистемного метаболизма используют формулу:

$$f = 1 - \frac{Cl_{общ}}{V},$$

где f — часть принятой внутрь дозы, которая достигает общего кровотока; $Cl_{общ}$ — общий клиренс (условный объём плазмы крови, л/мин, мл/мин, освобождающийся от ЛВ за единицу времени); V — скорость печёночного кровотока.

Таким образом, при пероральном введении лекарственный эффект замедлен и ослаблен.

Для предотвращения влияния пищи и желудочных соков на процессы всасывания ЛВ его следует принимать внутрь натощак, т. е. за 30 мин до еды. В это время в желудке и верхнем отделе кишечника не содержится пищи и поэтому не выделяются пищеварительные соки. Внутрь вводятся ЛВ в форме растворов, порошков, таблеток, капсул, пилюль. Для того чтобы предотвратить разрушение некоторых ЛВ в кислой среде желудка, используют таблетки, покрытые плёнками, устойчивыми к действию желудочного сока, не распадающимися в щелочной среде кишечника. Имеются лекарственные формы (например, таблетки с многослойным покрытием), обеспечивающие постепенное всасывание действующего начала, что позволяет пролонгировать терапевтическое действие препарата.

При приёме препарата внутрь для получения эффекта в желудочно-кишечном тракте активная субстанция должна высвободиться из лекарственной формы. Для препаратов, плохо абсорбирующихся, имеется возможность создания высокой концентрации их в кишечнике без попадания в общий кровоток, что, наряду с высокой эффективностью, обеспечивает отсутствие системных побочных эффектов. Однако при этом пути введения может иметь место неравномерное распределение лекарственного средства в разных отделах кишечника.

Введение лекарственных средств через рот невозможно или затруднено при рвоте, судорогах и бессознательном состоянии больного.

Иногда ЛВ вводят *дуоденально*, т. е. через зонд в двенадцатиперстную кишку (например, магнезии сульфат в качестве желчегонного средства с диагностической целью), что даёт возможность быстро создать высокую концентрацию вещества в кишечнике.

Ректально, т. е. в прямую кишку, ЛВ вводятся в виде суппозиториев (свечей) или лекарственных клизм объёмом не более 50–100 мл для взрослого. Ректальное введение препаратов позволяет избежать раздражающего действия веществ на слизистую желудка, а также даёт возможность применения ЛВ в тех случаях, когда затруднено или неосуществимо их применение перорально (тошнота, рвота, спазм или непроходимость пищевода). Всасываясь из ампулы прямой кишки, ЛВ попадают в кровь не через воротную вену, а по системе нижней полой вены, минуя, таким образом, печень. Поэтому сила фармакологического действия ЛВ и точность дозировки при ректальном способе применения выше, чем при введении через рот, что позволяет вводить не только средства, рассчитанные преимущественно на местное действие (местноанестезирующие, противовоспалительные, дезинфицирующие), но и вещества общего действия (снотворные, анальгетики, антибиотики, сердечные гликозиды и др.).

При пероральном введении ЛВ скорость его всасывания обычно небольшая, биодоступность ЛВ, как правило, невелика, так как всасывается только часть введённого препарата; кроме того, многие препараты разрушаются в желудочно-кишечном тракте, а всосавшиеся вещества проходят через печень, где многие из них подвергаются биологической трасформации, что приводит к уменьшению биодоступности. Поэтому перорально обычно назначают вещества в суточных и курсовых дозах. Следует заметить, что при пероральном введении доза ЛВ выше соответствующих доз для инъекционного введения, так как при пероральном введении биодоступность препаратов ниже.

При пероральном введении ЛВ может наблюдаться их взаимодействие с пищей, молоком, соками и другими жидкостями. Поэтому фармакокинетические эксперименты проводят в условиях стандартизации пищевого и питьевого режимов. В экспериментах на животных имеет значение степень измельчения ЛВ. В тех случаях, когда это позволяют условия эксперимента, ЛВ в виде стандартного измельчённого

порошка вводят непосредственно в органы желудочно-кишечного тракта натощак с помощью специальных внутрижелудочных или дуоденальных зондов.

2.2.2. Парентеральные пути введения. Все виды парентерального введения (пути введении минуя желудочно-кишечный тракт) преследуют одну и ту же цель — скорее и без потерь доставить ЛВ во внутренние среды организма или непосредственно в патологический очаг.

При инъекционном внутривенном введении ЛВ быстро поступают в кровоток, их биодоступность велика. Экспериментальным животным внутривенное введение проводят следующим образом: крысам и мышам — в хвостовую, собакам, кошкам, обезьянам — в бедренную вену. При необходимости хронического внутривенного введения ЛВ допускается использование внутрибрюшинного введения вместо внутривенного. Однако при определении параметров фармакокинетики ЛВ препарат должен вводиться внутривенно.

Ингаляционный путь — наиболее физиологичный из естественных путей введения. Препараты в виде аэрозолей используют преимущественно для получения местного эффекта (при бронхиальной астме, воспалительных процессах дыхательных путей), однако многие вещества, введённые таким способом, всасываются и проявляют резорбтивное (общее) действие (адреналин, изадрин, дикаин, амидопирин, большинство антибиотиков и др.). Вдыхание газообразных или мелкодиспергированных твёрдых и жидких лекарственных препаратов (аэрозолей) обеспечивает почти столь же быстрое попадание веществ в кровь, как и при внутривенном введении, не сопровождаясь травмой от инъекционной иглы, особенно ощутимой для детей, лиц старческого возраста и истощённых больных. Эффектом действия легко управлять, изменяя концентрацию вещества во вдыхаемом воздухе. Скорость всасывания зависит также от объёма дыхания, активной поверхности альвеол и их проницаемости, растворимости веществ в липидах, ионизации молекул ЛВ, скорости тока крови и др.

Чтобы облегчить ингаляционное применение нелетучих растворов, используют специальные распылители (ингаляторы), а для введения и дозирования газообразных веществ (закись азота) и летучих жидкостей (эфир, фторотан) служат наркозные аппараты искусственной вентиляции лёгких.

Накожный способ применения ЛВ широко используют в дерматологии для непосредственного воздействия на патологический процесс. Некоторые вещества, обладающие высокой липофильностью, могут частично проникать через кожу, всасываться в кровь и оказывать системное действие. Втирание в кожу мазей и линиментов, содержащих ЛВ, способствует более глубокому их проникновению и всасыванию в кровь. Из мазевых основ ланолин, спермацет и свиной жир обеспечивают наиболее глубокое проникновение ЛВ в кожу, поскольку эти мазевые основы ближе по составу к липидам человека, чем вазелин. В последнее время разработаны специальные «терапевтические системы» для чрескожного поступления ЛВ (например, нитроглицерина) в системный кровоток. Такие системы представляют собой особые лекарственные формы, которые фиксируются клейким веществом на коже и обеспечивают медленное и длительное всасывание лекарственного средства, за счёт чего пролонгируются его эффекты.

Введение ЛВ в конъюнктивальный мешок глаза, наружный слуховой проход, интраназально и на слизистую ротовой полости преследует чаще всего воздействие на течение воспалительных процессов в соответствующих органах (конъюктивиты, отиты, риниты, стоматиты). В некоторых случаях, проникая во внутренние среды, вводимые местно вещества способны оказывать резорбтивный эффект (например, холиномиметические и антихолинэстеразные препараты при глаукоме).

Интраназально с целью получения резорбтивного антидиуретического эффекта при несахарном диабете назначают гормональный препарат, содержащий вазопрессин.

Внутриполостное введение лекарственных препаратов применяют сравнительно редко. Внутрибрюшинно (например, антибиотики) вводят, как правило, во время брюшнополостных операций.

Внутрисуставной и внутриплевральный способы введения целесообразны для лечения воспалительных процессов (артритов, плевритов) различной этиологии.

Наиболее часто из парентеральных путей введения используют инъекционные, включающие внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный, субарахноидальный, субдуральный, субокципитальный, внутрикостный и др.

Внутрикожный путь введения служит преимущественно диагностическим целям (например, проба на повышенную индивидуальную чувствительность к антибиотикам и местным анестетикам, диагностика туберкулёза), а также для профилактической вакцинации.

Внутривенный способ введения ЛВ даёт возможность быстро создать в крови максимальную их концентрацию и получить выраженный лечебный эффект, что особенно важно при оказании неотложной помощи. Для внутривенного введения используются исключительно водные стерильные растворы лекарственных препаратов; категорически запрещается введение в вену суспензий и масляных растворов вследствие возможной опасной для жизни эмболии (закупорки) сосудов жизненно важных органов, а также веществ, вызывающих интенсивное свёртывание крови и гемолиз. Различают однократное внутривенное вливание, дробное и капельное введение.

Чаще ЛВ в вену вводят (особенно детям) медленно, так как многие из них способны вызвать эффект слишком быстро, что не всегда желательно и может быть опасным для жизни (строфантин, ганлиоблокаторы, плазмозамещающие жидкости и др.); в таких случаях удобно использовать капельное вливание растворов. Начинают обычно с 10–15 капель в минуту, постепенно увеличивая скорость; максимальная скорость введения может достигать 80–100 капель в минуту.

Вводимое внутривенно вещество необходимо растворять в изотоническом растворе хлорида натрия или 5% растворе глюкозы. Разведение ЛВ в гипертонических растворах (например, в 20–40% растворах глюкозы), за исключением отдельных случаев, менее целесообразно ввиду возможного повреждения эндотелия сосудов.

Внутриартериальное введение позволяет создать в области, которая кровоснабжается данной артерией, высокие концентрации вещества. Таким путём иногда вводят противоопухолевые средства. Для уменьшения их общего токсического действия отток крови может быть искусственно затруднён (путём пережатия вен). Внутриартериально иногда вводят также рентгеноконтрастные препараты при проведении ангиографии с целью точной локализации опухоли, тромба, аневризмы и др.

Из инъекционных способов введения широко распространены подкожный и внутримышечный. Ими пользуются при невозможности перорального или внутривенного введения препарата, а также с целью пролонгирования фармакотерапевтического эффекта.

Медленное всасывание ЛВ (особенно масляных растворов) позволяет создать в подкожной клетчатке или мышцах депо, из которого оно постепенно поступает в кровь и находится в ней в необходимой концентрации. Подкожно и внутримышечно не следует вводить вещества, обладающие выраженным местнораздражающим действием, так как это может быть причиной воспалительных реакций, инфильтратов и даже некроза.

При инъекционном подкожном введении скорость поступления лекарственных веществ уменьшается. Однако из-за отсутствия процессов разрушения ЛВ в месте введения их биодоступность так же велика, как и при внутривенных инъекциях. Так, инсулин при инсулинзависимой форме сахарного диабета вводят подкожно для постепенного, медленного и достаточно равномерного поступления препарата. При этом энтеральное введение данного препарата невозможно, из-за того что в желудочно-кишечном тракте инсулин подвергается практически 100%-му разрушению. Экспериментальным животным ЛВ подкожно обычно вводят в лапку или под кожу спины, около позвоночника.

Внутримышечное введение по влиянию на фармакокинетику ЛВ в целом сходно с подкожным, однако при этом обычно наблюдается более быстрое поступление ЛВ в кровь. Экспериментальным животным ЛВ внутримышечно вводят в бедренную или ягодичную мышцы.

ЛВ, плохо проникающие через гематоэнцефалический барьер, могут быть введены под оболочки мозга — субарахноидально, субдурально, субокципитально. Например, так применяют некоторые антибиотики при инфекционном поражении тканей и оболочек мозга или рентгеноконтрастные средства при миелографии.

Внутрикостные инъекции используют при технической невозможности внутривенного введения детям, лицам старческого возраста (интрастернально — в грудину), а также иногда для введения больших объёмов плазмозамещающих средств (в губчатое вещество пяточной кости).

Электрофорез образно называют бескровной инъекцией. Анионы и катионы ионизированных ЛВ способны под воздействием электрического поля проникать в организм через неповреждённую кожу (по протокам потовых и сальных желёз) и слизистые оболочки. Частично они задерживаются в тканях, связываясь с белками клеток и межклеточной жидкости, а частично всасываются, поступая в общий кровоток.

2.3. Всасывание лекарственных веществ в организме

Процесс всасывания ЛВ представляет собой способ проникновения (транспорта) их из места введения во внутренние среды организма, отграниченные барьерными мембранами. Эти мембраны могут состоять из нескольких слоёв клеток (кожа, плацента), одного слоя клеток (кишечный эпителий) или, чаще всего, являться клеточными оболочками и мембранами субклеточных культур, состоящими из слоёв липидных и белковых молекул.

Несмотря на разнообразие этих биологических структур, принцип проникновения ЛВ через них сходен. В основе его лежат следующие механизмы: пассивная диффузия, облегчённая диффузия, фильтрация, активный транспорт (рис. 2.2, цветная вклейка).

Пассивная диффузия. Процесс пассивной диффузии веществ протекает без затрат энергии и возможен в обоих направлениях, т. е. как внутрь клетки, так и из неё. Направление и величина потока вещества J, диффундирующего через мембрану, согласно уравнению Фика, определяется градиентом концентрации вещества в мембране или разностью концентраций по обе ее стороны:

$$J = -D \operatorname{grad} C^{\text{м}} \approx \frac{D(C_1^{\text{м}} - C_2^{\text{м}})}{l},$$

где D — коэффициент диффузии; $C_1^{\text{м}}$ и $C_2^{\text{м}}$ — концентрации вещества на поверхности мембраны, l — толщина мембраны. Так как измерить концентрации на поверхности мембраны трудно, то пользуются концентрациями в растворе вблизи поверхности, C_1

и C_2, причем $C_1^м = KC_1$, $C_2^м = KC_2$, где K — коэффициент распределения. Путем подстановки получим

$$J = \frac{DK}{l}(C_1 - C_2),$$

где $DK/l = P$ — коэффициент проницаемости мембраны, который может быть определен экспериментально (по измерению мембранного потенциала).

Как следует из уравнения Фика, пассивная диффузия происходит в направлении от более высокой к более низкой концентрации ЛВ (по градиенту концентрации) и продолжается до полного выравнивания концентраций по обе стороны мембраны, т. е. достижения термодинамического равновесия. Таким путём всасываются липофильные (главным образом, неполярные) вещества. Чем выше липофильность веществ, тем легче они проникают через клеточную мембрану. Однако значительное количество ЛВ является либо слабыми щелочами, либо слабыми кислотами, склонными к ионизации.

Пассивная диффузия в этом случае зависит от pH среды и pK_a вещества — значения pH, при котором половина молекул диссоциирована.

Нейтральные молекулы вследствие большей липофильности легче диффундируют через мембрану, чем ионы и полярные молекулы. Соотношение между неионизированной (HA) и ионизированной (A^-) формами молекул ЛВ (слабой кислоты) легко определяется при помощи уравнения Хендерсона–Хассельбаха:

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-,$$

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

Изменение pH среды на единицу приводит, таким образом, к сдвигу степени диссоциации растворённых в ней молекул на десятичный порядок. Снижение pH (подкисление) среды, если ЛВ — слабая кислота, ведёт к повышению концентрации неионизированной формы HA и усиливает процесс транспорта. И наоборот, повышение pH желудочного сока (подщелачивание) при приёме натрия гидрокарбоната препятствует всасыванию, например, ацетилсалициловой кислоты из желудка. С другой стороны, лекарственные средства — слабые основания (например, амидопирин и др.) в кислой среде почти полностью диссоциированы и не могут всасываться из желудка на высоте пищеварения.

Меньшая степень кислотности желудочного сока у детей раннего возраста (pH около 5,0) также оказывает существенное влияние на всасывание лекарственных средств, способных к диссоциации в желудке, ускоряя, по сравнению со взрослыми, всасывание органических оснований и замедляя всасывание органических кислот.

Облегчённая диффузия. Представляет собой транспорт ЛВ через биологические мембраны с участием молекул специфических переносчиков. В этом случае, как и при пассивной диффузии, перенос веществ происходит по градиенту концентрации и не связан с затратой энергии, но скорость его значительно выше. Примерами поступления веществ с помощью облегчённой диффузии может служить транспорт в клетку пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот, некоторых биологически активных веществ и ЛВ (глюкозы, глицерина, аминокислот, витаминов и др.). Классический пример облегчённой диффузии — абсорбция на поверхности эпителиальных клеток тонкой кишки цианокобаламина (витамина B_{12}) при участии специального транспортного белка гастромукопротеида («внутреннего фактора Кастла»).

Фильтрация. Вещества, нерастворимые в липидах, плохо диффундируют через биологические мембраны и могут частично проникать внутрь клетки путём фильтра-

ции через поры клеточных стенок. Диаметр пор в мембранах эпителия кишечника не превышает 0,4 нм, или 4–5 Å, поэтому через них проникает только вода, некоторые ионы (Cl и др.), а также мелкие гидрофильные молекулы (например, мочевина). Зависит интенсивность фильтрации от гидростатического и осмотического давления.

Активный транспорт — это перенос молекул ЛВ через биомембраны против градиентов их химических концентраций (т. е. транспорт «вверх») с помощью специальных транспортных систем (молекул-носителей), сопряжённый с затратой энергии.

В биологических мембранах существуют специальные ферменты переносчики, обеспечивающие активный транспорт. Приблизившаяся к мембране полярная молекула (или ион) ЛВ вступает в обратимый комплекс с переносчиком. Интенсивность комплексирования зависит от структуры молекул вещества. Для активного транспорта характерны структурная специфичность (т. е. структурное или конформационное соответствие между молекулами переносимого вещества и осуществляющими их транспорт молекулами), насыщаемость системы транспорта, а также возможность конкурентного её торможения. Так, для парааминобензойной кислоты сродство к переносчикам в 1600 раз больше, чем у её структурного аналога стрептоцида. Поэтому ЛВ, эффект которых основан на принципе конкурентного антагонизма, назначаются в высоких, постоянно поддерживаемых дозах. Однако возможности переносящей системы ограничены количеством молекул-переносчиков. Именно поэтому повышение дозы не всегда приводит к увеличению терапевтического эффекта. В таких случаях избыток ЛВ выводится из организма в неизменённом виде.

Сущность активного транспорта — циклическое превращение переносчика: высокое сродство с ЛВ на наружной поверхности мембраны и низкое — на внутренней, где образовавшийся комплекс вновь распадается. ЛВ попадает в клетку, а переносчик возвращается к наружной поверхности мембраны и т. д. Этот механизм получил название «биологического насоса».

Активный транспорт против градиента концентрации создаёт в тканях неравномерное распределение веществ: при переносе, например, йода в фолликулы щитовидной железы из плазмы крови градиент концентрации составляет от 50 до 500. Столь значительное увеличение химического потенциала транспортируемых веществ осуществляется за счёт энергии окислительного фосфорилирования или гидролиза АТФ специальными транспортными АТФ-азами. Угнетение АТФ-аз при различных патологических состояниях, а также под влиянием метаболических ядов может существенно нарушать абсорбцию и внутриклеточное распределение лекарственного вещества.

С помощью активного транспорта осуществляется абсорбция в пищеварительном тракте низкомолекулярных катионов Na^+, K^+, Ca^{2+}, глюкозы, аминокислот, сильных органических кислот и оснований, сердечных гликозидов, пиримидиновых оснований, тиамина и других витаминов группы В, кортикостероидных гормонов и др.

Кроме того, низкомолекулярные вещества могут проникать в клетку в процессе пиноцитоза и фагоцита. Пиноцитоз (от греч. *pino* — пить, *kytos* — вместилище) — это корпускулярная абсорбция, или пересорбция, осуществляемая путём впячивания (инвагинации) поверхности биомембраны с последующим образованием везикулы (вакуоли) вокруг транспортируемого вещества, как и при фагоцитозе. Везикула мигрирует сквозь толщу мембраны, и, наконец, наступает эструкция (высвобождение) содержимого пузырька в плазму или во внутриклеточное пространство. Путём пиноцитоза клетки могут захватывать макромолекулы (белки и нуклеиновые кислоты с диаметром частиц не более 750 нм), а также, по-видимому, жирные кислоты и жирорастворимые витамины. Представляет интерес возможность поступления внутрь клеток липосом — новой перспективной лекарственной формы в виде фосфоли-

пидных пузырьков с включёнными в их полость ЛВ. Липосомы предохраняют эти вещества от разрушения ферментными системами организма и быстрой почечной экскреции, значительно пролонгируя их действие.

2.4. Распределение лекарственных веществ в органах и тканях

В результате абсорбции вещества попадают в кровь, а затем в разные органы и ткани. Фракция свободного (несвязанного) вещества в плазме крови через определённый промежуток времени после его введения относительно исходной дозы представляет собой биодоступность препарата. При внутривенном введении ЛВ его биодоступность равна единице. После перорального введения ЛВ его биодоступность может быть меньше единицы вследствие ряда причин: неполного всасывания; метаболизма в желудочно-кишечном тракте; метаболизма в печени при первичном попадании с портальной кровью.

Параметры фармакокинетики и режим дозирования определяют:

— уровень ЛВ в организме в любой момент времени;

— сколько времени необходимо для достижения постоянного уровня ЛВ в организме при повторных введениях;

— сколько времени потребуется для полного выведения ЛВ из организма.

Концепция объёма распределения (V_D) лекарственного вещества предполагает, что в первом приближении организм — это хорошо перемешиваемый сосуд, поэтому:

$$V_D = \frac{A}{[D]_P},$$

где A — количество ЛВ в организме; $[D]_P$ — концентрация ЛВ в плазме; V_D — это и расчётная, и воспроизводимая, и клинически значимая величина.

Величина V_D представляет не действительный, а кажущийся объём. Термин «объём» используется в метафорическом смысле. Кажущийся объём распределения — это гипотетический объём жидкости, необходимый для равномерного растворения всей введённой дозы препарата в концентрации, равной его концентрации в плазме крови. Кажущийся объём распределения показывает, насколько активно ЛВ распределяется в органах и тканях. При высоком V_D препарат активно проникает в органы и ткани, накапливается в жировой ткани, а в крови остаётся в незначительном корличестве.

При массе тела 70 кг обычно наблюдаются следующие величины V_D:

3 л — ЛВ находится только в плазме крови;

15 л — ЛВ находится в плазме крови (3 л) и межклеточной жидкости (12 л);

40 л — ЛВ распределено во внеклеточной и внутриклеточной жидкости;

400–1000 л — ЛВ депонируется в тканях и его концентрация в крови низкая.

Значения V_D обычно легко определить. Для этого нужно ввести болюс ЛВ, определить уровни ЛВ в плазме в разные моменты времени и затем путём экстраполяции определить концентрацию в момент времени, равный нулю.

При начале лечения ЛВ нет в организме и с помощью первоначальной дозы, называемой нагрузочной дозой (*loading dose*), достигается необходимое количество ЛВ ($A_{цел}$) в месте действия. Поскольку нагрузочная доза (LD) не всегда соответствует значению $A_{цел}$ и не всё количество введённого ЛВ может всосаться, в уравнение вводится дополнительный параметр — биодоступность (B) (*bioavailability*), т. е. фракция введённой дозы (от 0 до 1), которая попала в кровоток:

$$LD \cdot B = A_{цел},$$

откуда

$$LD = \frac{A_{\text{цел}}}{B} = \frac{V_{\text{D}} \cdot [\text{D}]P_{\text{цел}}}{B}.$$

Таким образом, параметры V_{D}, $[\text{D}]P_{\text{цел}}$ и B определяют величину нагрузочной дозы LD. Другими словами, необходимая доза для достижения таргетной концентрации ЛВ в плазме $P_{\text{цел}}$ определяется величинами V_{D}, B и $[\text{D}]P_{\text{цел}}$. Отсюда понятно, что фармакокинетические параметры имеют не абстрактное, а большое клиническое значение, позволяя определять индивидуальную дозу ЛВ.

Используя другой парметр — клиренс ЛВ (Cl) (объём крови или плазмы, из которого исчезает определённое количество ЛВ в единицу времени), отражающий процесс элиминации — удаления ЛВ из организма с помощью систем очищения (метаболизма и экскреции), можно определить величину поддерживающей дозы (M_{D}) — количество ЛВ, принимаемое с регулярными интервалами, и интервал между дозами (D_{I}). В равновесном состоянии концентрация ЛВ в плазме в основном определяется его клиренсом. В этом случае скорость введения ЛВ должна равняться скорости элиминации ЛВ:

$$\frac{M_{\text{D}}}{D_{\text{I}}} = \frac{[\text{D}]P_{\text{цел}} \cdot Cl}{B}.$$

2.4.1. Фармакокинетические кривые. Обычно в эксперименте и клинике изучают кинетические кривые, характеризующие изменение концентрации ЛВ в крови, реже — в ткани и ещё реже — в клетке и её компартментах. Это связано с тем, что кровь является наиболее доступной для исследования интерстициальной жидкостью. Кроме того, системное действие ЛВ обусловлено их присутствием в крови.

В экспериментах для построения фармакокинетических кривых используют или меченые ЛВ (радиоактивная или другая метка), или же специфические методы определения данных препаратов (физико-химические, иммунологические, микробиологические и др.). Наиболее чувствительным современным методом считается высокоэффективная жидкостная хроматография. Необходимо отметить, что методы определения ЛВ также должны позволять детектировать его активные метаболиты.

Изменение концентрации ЛВ во времени называется фармакокинетическими кривыми. Обычно в эксперименте определяется несколько точек зависимости концентрации ЛВ (C) от времени (t). Интерполяция зависимости $C(t)$ непрерывной гладкой функцией и является фармакокинетической кривой. Несмотря на кажущуюся сложность и разнообразие фармакокинетических кривых, представленных на рис. 2.3, все они имеют характерные участки.

1. Стадия индукции реакции. На ней не происходит существенных изменений концентрации ЛВ.
2. Стадия уменьшения концентрации ЛВ.
3. Стадия прекращения изменения концентрации ЛВ в связи с уменьшением его концентрации практически до нуля.
4. Стадия практически постоянной концентрации.
5. Стадия увеличения концентрации ЛВ.
6. Стадия выхода на плато.

Анализ фармакокинетических кривых. Проведём анализ типичной фармакокинетической кривой, представленной на рис. 2.4.

Наиболее важными являются следующие характеристиками данной фармакокинетической кривой:

1) C_{max} — максимально достигаемая концентрация ЛВ;
2) t_{max} — время достижения максимальной концентрации ЛВ;
3) $t_{1/2}$ — время полувыведения ЛВ от максимальной концентрации (время полуэлиминации, полууменьшения концентрации ЛВ);

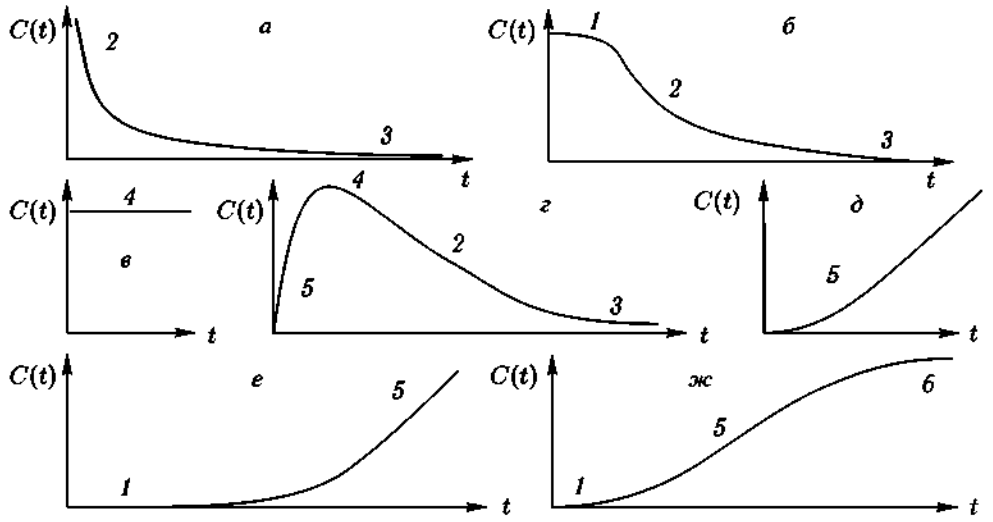


Рис. 2.3. Различные виды фармакокинетических кривых: *1–6* — участки кинетических кривых (комментарии в тексте); *а* — внутривенное одномоментное введение; *б* — внутривенное капельное введение; *в* — постоянная внутривенная инфузия; *г* — внутримышечная или подкожная инъекция; *д*, *е*, *ж* — поступление ЛВ в организм при пероральном введении

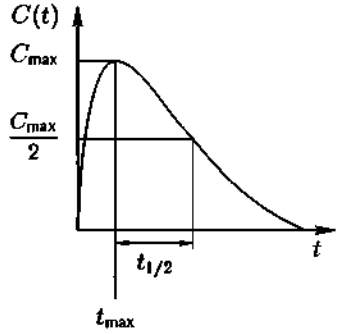


Рис. 2.4. Основные параметры фармакокинетической кривой

4) площадь под фармакокинетической кривой, или интегральная фармакокинетическая кривая;

5) значение производной в каждой точке фармакокинетической кривой, или дифференциальная фармакокинетическая кривая.

Заметим, что максимально достигаемая концентрация ЛВ и время её достижения определяются в первую очередь способом введения и дозой ЛВ (см. рис. 2.3). Так, если ЛВ вводится внутрисосудисто, то в момент введения концентрация ЛВ в крови максимальна, т. е. $t_{max} = 0$. Время полувыведения зависит в основном от химической структуры ЛВ, что определяет его биотрансформацию и выведение из организма, а также от наличия сопутствующей патологии, прежде всего заболеваний печени, почек, эндокринных желёз и др. Параметры интегральной и дифференциальной фармакокинетических кривых определяются всеми указанными факторами.

Обычно ЛВ вводят в определённой дозе, которую можно охарактеризовать массой ЛВ (m). Между тем, в фармакокинетике чаще определяют концентрацию ЛВ в органах или тканях организма. Для того чтобы связать массу ЛВ и его концентрацию,

используют следующую формулу:

$$C = \frac{m}{V_D}, \tag{2}$$

где V_D — объём распределения ЛВ.

Объём распределения ЛВ — важнейшая фармакокинетическая характеристика, а его определение — одна из первейших задач фармакокинетики. Если V не более 5% массы организма, то ЛВ распределяется только в крови. Если V от 5 до 100%, то происходит распределение лекарственного вещества по органам и тканям. Если V более 100%, то происходит накопление (кумуляция) ЛВ.

Заметим, что параметры в формуле (2) могут быть и постоянными, и переменными величинами. Практические методы определения объёма распределения ЛВ рассматриваются ниже.

Интегральная и дифференциальная фармакокинетические кривые. Для количественного анализа фармакокинетических кривых используют их интегральные и дифференциальные отображения. Интегральная фармакокинетическая кривая *AUC* (*area under curve*) описывает изменение площади под фармакокинетической кривой с течением времени (рис. 2.5):

$$AUC = \int_0^\infty C(t)\,dt.$$

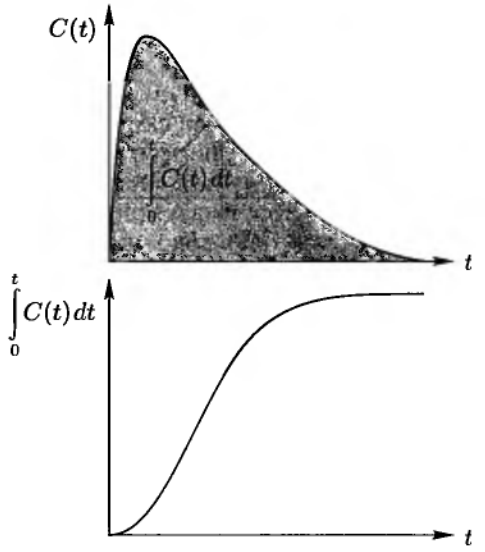


Рис. 2.5. Интегральная фармакокинетическая кривая

Современные компьютерные программы для расчёта площади под фармакокинетической кривой используют различные алгоритмы, в частности метод трапеций [12].

После определения *AUC* рассчитывают величину клиренса:

$$Cl = \frac{m}{AUC}, \tag{3}$$

где m — масса введённого ЛВ.

Размерность клиренса определяется соотношением объём/время, например мл/мин, л/ч. Клиренс характеризует суммарную эффективность систем выведения (элиминации) ЛВ из организма лёгкими, кожей, печенью, почками и др. Величина клиренса характеризует объём тест-ткани, освобождающейся от ЛВ за единицу времени. Уменьшение величины клиренса свидетельствует о серьёзных изменениях в функционировании систем организма и о накоплении в организме токсичных продуктов метаболизма.

Следует отметить, что под совершенно различными фармакокинетическими кривыми может быть заключена одна и та же площадь (рис. 2.6). Основное различие

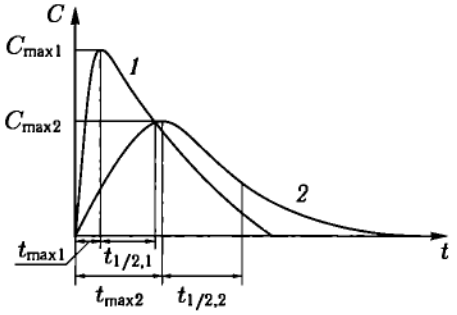


Рис. 2.6. Различные фармакокинетические кривые с одинаковой площадью под ними

между приводимыми на рисунке кривыми заключается в количественных значениях фармакокинетических параметров: максимальная концентрация ЛВ для кривой *1* больше, а время достижения максимальной концентрации и время полувыведения меньше, чем для кривой *2*. Соответственно, для ЛВ, описываемого кривой *1*, характерны более быстрое поступление (всасывание) и более быстрое выведение, чем для ЛВ, описываемого кривой *2*.

Следует иметь в виду, что так как площади под кривыми *1* и *2* равны, то терапевтический эффект от введения ферментативных препаратов, кофакторов и ингибиторов ферментов, витаминов и ряда других лекарственных средств одинаков, независимо от того, какой кинетической кривой описывается изменение их концентрации. Между тем, быстрое достижение больших значений максимума кривой *1* опасно возможностью развития токсических осложнений из-за высокой вероятности того, что C_{max2} превысит индивидуальный терапевтический диапазон. Кроме того, высокая скорость элиминации подразумевает повышенную нагрузку на экскреторные системы организма. Поэтому обычно время полувыведения таких препаратов существенно возрастает при нарушении функции печени или почек. В связи с этим у пациентов с нарушенной функцией экскреторных органов и систем при прочих равных условиях следует предпочитать препараты, описываемые кинетической кривой *2*, т. е. следует предпочитать препараты с медленной скоростью поступления и большими значениями времени полувыведения. Построение интегральных кинетических кривых важно для ЛВ с алкилирующим механизмом действия.

Простейший способ получения дифференциальных фармакокинетических кривых — определение тангенсов углов наклона касательных (α) в каждой точке исходной фармакокинетической кривой (рис. 2.7):

$$\operatorname{tg}\alpha = \frac{dC}{dt}.$$

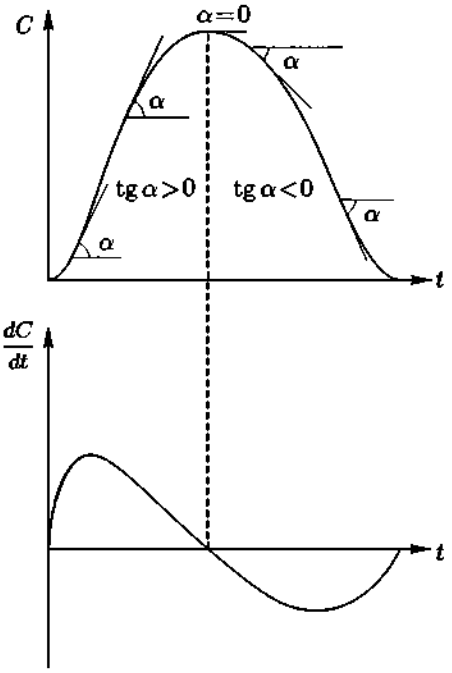


Рис. 2.7. Дифференциальная кинетическая кривая

Как будет показано ниже, определение основных фармакокинетических параметров необходимо для планирования экспериментальных фармакологических исследований, а также оптимизации фармакологической терапии с тем, чтобы повысить её эффективность и снизить вероятность возникновения побочных эффектов.

2.4.2. Модельные представления фармакокинетики. В организме ЛВ испытывают ряд сложных трансформаций, поступая из места введения в кровь, а из крови в эфферентные органы и ткани. В тканях, печени, почках, лёгких и других органах ЛВ подвергаются биотрансформации. В конечном итоге ЛВ или их метаболиты выводятся из организма, чаще всего с мочой или жёлчью. В большинстве случаев учёт всех процессов затруднён из-за их чрезвычайной сложности. Кроме того, многие из приведённых процессов практически невозможно изучать экспериментально. Между тем существует необходимость количественно описывать изменение концентрации ЛВ в организме. Для того чтобы решить данную задачу, в фармакокинетике используются модельные представления об организме [12].

Центральным понятием модельного представления фармакокинетики об организме является камера (*compartment*). Камера представляет собой ограниченный в пространстве объём жидкости (ткани), при этом концентрация ЛВ во всех пространственных точках данной камеры предполагается одинаковой. Объём камеры также предполагается практически постоянным и не меняющимся с течением времени.

Камерное представление об организме модельное, упрощённое. В качестве камер могут выступать кровь, лимфа, межтканевая жидкость и жидкость естественных анатомических областей. Камерные модели позволяют описывать реальное изменение концентрации ЛВ в организме в том случае, если выполняются следующие условия.

1. Время элиминации ЛВ из камеры существенно больше времени, необходимого для установления одинаковой концентрации ЛВ в камере. Тогда концентрацию ЛВ во всех точках камеры можно считать одинаковой.

2. ЛВ не обладает диуритическим или осмотическим действием, приводящим к изменению объёма камеры. В противном случае необходимо учесть изменения объёма камеры, зависящие от концентрации ЛВ.

Как показывает практика, для большинства ЛВ приведённые условия выполняются, что позволяет описывать изменение их концентрации в организме с помощью камерных моделей.

В зависимости от числа камер, использованных при составлении модели, различают одно-, двух- и многокамерные модели.

2.4.3. Однокамерные фармакокинетические модели. В простейшем случае предполагают наличие только одной камеры. Такие фармакокинетические модели называются однокамерными.

Схема простейшей однокамерной модели приведена на рис. 2.8.

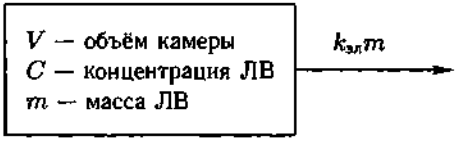


Рис. 2.8. Схема простейшей однокамерной фармакокинетической модели

При этом предполагается, что ЛВ введено в камеру одномоментно, а скорость его выведения пропорциональна количеству ЛВ, находящегося в данный момент в камере. Фактически однокамерной фармакокинетической модели соответствует случай одномоментного введения ЛВ в кровь, при этом неметаболизированное ЛВ с постоянной скоростью выводится из организма.

Согласно закону действующих масс

$$\frac{dm}{dt} = -k_{эл}m, \tag{4}$$

где m — масса ЛВ, $k_{эл}$ — константа элиминации (выведения) ЛВ.

Чем больше константа скорости элиминации, тем быстрее ЛВ выводится из организма, тем меньше время его действия.

Решение уравнения (4) запишется как

$$m = m_0 \exp(-k_{эл}t),$$

где m_0 — начальная масса ЛВ.

Следует заметить, что в реальных фармакокинетических исследованиях достаточно часто измеряют не массу ЛВ, а его концентрацию. Чаще всего концентрацию ЛВ определяют в крови. Забор крови у экспериментальных животных осуществляют из ушной вены (кролики), хвостовой вены (крысы), подкожной вены (собаки) и др. Концентрацию ЛВ определяют в цельной крови или в сыворотке.

Предполагая условный (кажущийся) объём камеры V постоянным, связь между массой и концентрацией ЛВ C запишем следующим образом:

$$m(t) = VC(t).$$

Тогда уравнение (4) перепишется как

$$\frac{dVC}{dt} = V\frac{dC}{dt} = -k_{эл}VC,$$

$$\frac{dC}{dt} = -k_{эл}C,$$

т. е.

$$C = C_0 \exp(-k_{эл}t), \tag{5}$$

где C_0 — начальная концентрация ЛВ.

Заметим, что ЛВ не может быть одномоментно введено в одинаковой концентрации во все точки камеры, поэтому после введения ЛВ начинается процесс диффузии ЛВ из места введения во все другие точки камеры. Уравнение (5) справедливо только в том случае, если константа скорости диффузии ЛВ на несколько порядков превышает константу скорости элиминации ЛВ.

Прологарифмировав уравнение (5), получаем

$$\ln C = \ln C_0 - k_{эл}t. \tag{6}$$

Таким образом, в случае простейшей однокамерной модели зависимость концентрации ЛВ от времени в полулогарифмических координатах является линейной. При этом тангенс угла наклона с точностью до знака равен константе скорости элиминации, а ордината точки пересечения прямой с осью абсцисс — логарифму начальной концентрации ЛВ (рис. 2.9). Поэтому параметры однокамерной фарма-

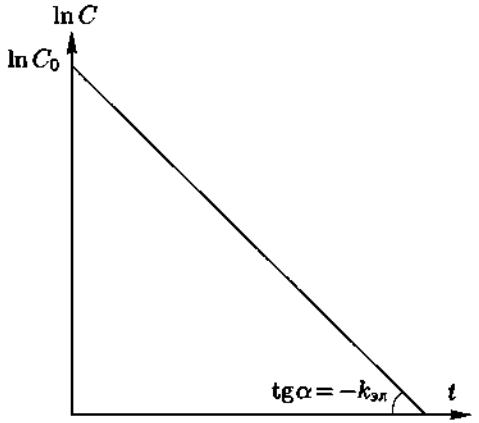


Рис. 2.9. Определение параметров простейшей однокамерной фармакокинетической модели

кокинетической модели определяются исходя из уравнения линейной регрессии. Параметры регрессии легко могут быть подобраны с помощью любого стандартного пакета статистических программ.

При экспериментальном изучении фармакокинетики рекомендуется брать не менее 6–8 животных для получения каждой экспериментальной точки. При этом, для того чтобы вычислить параметры однокамерной фармакокинетической модели, необходимо определение не менее 3 точек зависимости концентрация–время. Временные промежутки между точками могут быть выбраны равными или в виде геометрической прогрессии, например: 0,5 ч (30 мин), 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч [14].

Пример. В работе [19] изучали фармакокинетику диазоксида, вводимого внутривенно детям в дозе 12 мг. Результаты представлены в табл. 2.1. Определить параметры фармакокинетической модели.

Графически эти экспериментальные данные приведены на рис. 2.10.

По точке пересечения с осью ординат определяем $\ln C_0 = 2{,}3$, $m_0 = \exp[2{,}3] = 10$ мкг/мл. По тангенсу угла наклона находим $k_{эл} = 1{,}6\ ч^{-1}$, $V = C_0/m =$

Таблица 2.1

Фармакокинетика диазоксида после внутривенного введения

Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)	Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)
1	2,2	10	1,5
5	1,9	20	1,0

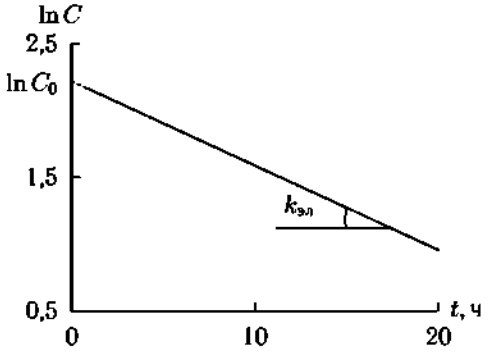


Рис. 2.10. Фармакокинетика диазоксида при внутривенном введении

$= 2000$ (мкг)/10 (мкг/мл) $= 200$ мл. Таким образом, кажущийся объём камеры составляет менее 5 % объёма тела. Следовательно, диазоксид находится только в крови.

2.4.4. Площадь под фармакокинетической кривой и клиренс. Определив C_0 и V, рассчитаем площадь под фармакокинетической кривой и клиренс для однокамерной фармакокинетической модели:

$$AUC = \int_0^\infty C(t)\,dt = \frac{m_0}{V}\int_0^\infty e^{-k_{эл}t}\,dt = \frac{m_0}{Vk_{эл}}.$$

Аналогично по формуле (3) рассчитаем величину клиренса:

$$Cl = \frac{m_0}{AUC} = k_{эл}V.$$

Таким образом, для линейной однокамерной фармакокинетической модели площадь под фармакокинетической кривой и величина клиренса зависят от константы скорости элиминации ЛВ, кажущегося объёма распределения и дозы ЛВ.

2.4.5. Время полувыведения лекарственного вещества. Важное свойство однокамерных моделей можно вывести непосредственно из уравнения (6). Обозначим как $C_0/2$ концентрацию, вдвое меньше начальной, а как $t_{1/2}$ — время достижения этой концентрации (время полувыведения ЛВ). Тогда

$$\ln(C_0/2) = \ln C_0 - k_{эл}t_{1/2},$$

или

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{эл}} \approx \frac{0{,}693}{k_{эл}}.$$

Таким образом, для однокамерных моделей время полувыведения ЛВ не зависит от его начальной концентрации. С другой стороны, независимость времени полувыведения ЛВ от его начальной концентрации является необходимым, но не достаточным

условием того, что кинетика изменения концентрации ЛВ описывается однокамерной фармакокинетической моделью.

2.4.6. Однокамерные фармакокинетические модели со всасыванием. Только в простейшем случае ЛВ вводится одномоментно в кровь. В более общем случае ЛВ вначале попадает в депо (мышцу, подкожно-жировую клетчатку, желудочно-кишечный тракт и др.), откуда постепенно поступает в кровь. Эта ситуация описывается однокамерной моделью со всасыванием (рис. 2.11). Обычно предполагается, что

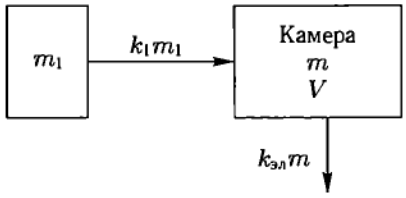


Рис. 2.11. Схема однокамерной фармакокинетической модели со всасыванием

введённый лекарственный препарат может всасываться в камеру пропорционально своей массе (Если предположить, что скорость поступления ЛВ постоянна, то данная модель будет описывать капельное введекние ЛВ в кровь.). Тогда дифференциальные уравнения закона действующих масс для данной модели запишутся следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{dt} &= -k_1 m_1, \\ \frac{dm}{dt} &= k_1 m_1 - k_{эл} m, \end{aligned} \tag{7}$$

где m_1 — масса вещества в месте введения; k_1 — константа скорости поступления препарата в камеру (константа скорости всасывания).

Предполагается, что начальная масса введённого ЛВ равна M, при этом в начальный момент времени в самой камере ЛВ нет. Тогда достаточно очевидно, что

$$m = \frac{Mk_1}{k_1 - k_{эл}} \left(\exp\left(-k_1 t\right) - \exp\left(-k_{эл} t\right)\right). \tag{8}$$

Отсюда, переходя к концентрациям, получаем

$$C = \frac{Mk_1}{V(k_1 - k_{эл})} \left(\exp\left(-k_{эл} t\right) - \exp\left(-k_1 t\right)\right)$$

или

$$C = C_0 \left(\exp\left(-k_{эл} t\right) - \exp\left(-k_1 t\right)\right), \tag{9}$$

где $C_0 = \dfrac{Mk_1}{V(k_1 - k_{эл})}$, т. е. величина C_0 характеризует кажущуюся величину начальной концентрации ЛВ в начальный момент времени (так как в реальных условиях в начальный момент времени ЛВ в камере нет).

Как правило, константа скорости всасывания много больше константы скорости элиминации ЛВ. Поэтому при малых временах протекания фармакокинетического процесса наиболее существенным является поступление ЛВ в камеру, тогда как элиминацией можно пренебречь. Напротив, при больших временах протекания процесса поступление ЛВ в камеру отсутствует — и концентрация ЛВ в камере изменяется за счёт элиминации. Таким образом, при малых временах протекания процесса уравнение (9) запишется следующим образом:

$$C(t)_{t \to 0} = C_0 \left(1 - \exp\left(-k_1 t\right)\right),$$

а при больших временах

$$C(t)_{t\to\infty} = C_0 \exp(-k_{эл}t).$$

При малых временах наблюдения за процессом можно разложить экспоненту в ряд Тейлора:

$$\exp(-k_1 t) = 1 - k_1 t + o(t).$$

Тогда

$$C(t)_{t\to 0} = C_0(1 - (1 - k_1 t)) = C_0 k_1 t.$$

Константы k_1, $k_{эл}$ поступления ЛВ в камеру и элиминации можно найти по тангенсам углов наклона асимптот, проведённых к начальным и конечным участкам графика в координатах $(C/C_0, t)$, при этом параметр C_0 находится как пересечение оси ординат с асимптотой к конечному участку графика в координатах $(\ln C_0, t)$ (рис. 2.12).

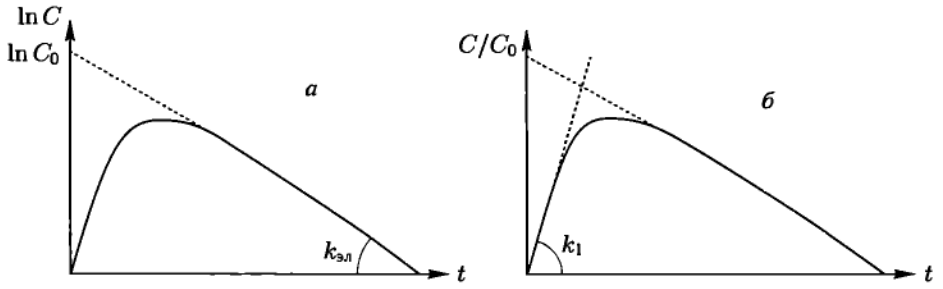


Рис. 2.12. Определение параметров однокамерной фармакокинетической модели со всасыванием: *а* — определение параметра C_0; *б* — определение константы всасывания и константы элиминации

Следует заметить, что для правильного определения показателей экспонент на каждую из них должно приходиться не менее 3–4 точек.

При проведении экспериментов с изучением фармакокинетики ЛВ при пероральном введении особое внимание следует уделять стандартизации пищевого и питьевого режима.

Оптимальным является введениие натощак измельчённого ЛВ экспериментальным животным через желудочный зонд. Наличие пищи в желудочно-кишечном тракте может изменять изучаемые фармакокинетические параметры. Лучше, если весь период изучения фармакокинетики ЛВ животные будут получать стандартный сухой корм и воду в режиме *ad libitum*. Следует помнить о том, что введение в рацион животных зелёных растений может привести к изменению фармакокинетики ЛВ из-за взаимодействия ЛВ с растительными компонентами.

Пример. В работе [13] приведены данные по фармакокинетике цефалексина в крови мышей, получивших этот препарат перорально в дозе 40 мг/кг. На основании данных табл. 2.2 можно определить параметры фармакокинетической модели.

Графически эти экспериментальные данные представлены на рис. 2.13. В полулогарифмических координатах определяем $\ln C_0 = 1{,}8$, $C_0 = 6{,}05$ мкг/мл (см. рис. 2.13, *а*); по тангенсу угла наклона конечных участков кривой — $k_{эл} = 0{,}2\ \text{ч}^{-1}$. В координатах $(C/C_0, t)$ (рис. 2.13, *б*) по тангенсу угла наклона начальных участков кривой определяем $k_1 = 0{,}9\ \text{ч}^{-1}$. Кажущийся объём камеры: $V = Mk_1/(m_0(k_1 - k_{эл})) = 80$ мл/кг. Таким образом, кажущийся объём камеры составляет менее 5% массы тела. Следовательно, цефалексин распределяется только в одной камере (крови).

Таблица 2.2

Фармакокинетика цефалексина после перорального введения

Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)	Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)	Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)
0,03	0,45	0,7	1,2	2,5	0,99
0,1	0,2	0,8	1,3	3	0,96
0,2	0,35	1	1,39	3,5	0,69
0,4	0,67	1,2	1,38	4	0,6
0,5	1	1,5	1,29	4,5	0,48
0,6	1,1	2	1,21	5	0,31

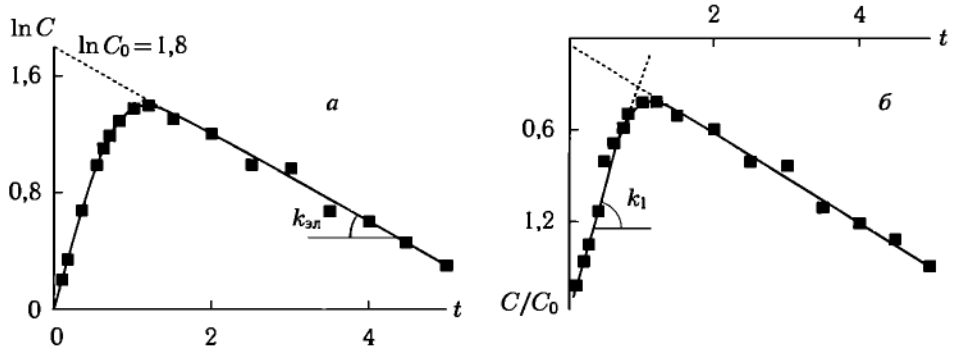


Рис. 2.13. Фармакокинетика цефалексина после перорального введения

2.4.7. Двухкамерные фармакокинетические модели. Анализ фармакокинетики многих ЛВ показал, что в ряде случаев экспериментальные данные не удаётся «спрямить» в полулогарифмических координатах даже при условии непосредственного введения препарата в исследуемую ткань. Это означает, что предположение о нахождении ЛВ только в одной камере — неправильное. Следовательно, для описания экспериментальных данных необходимо использовать более сложные, многокамерные модели.

Следует заметить, что применение чрезмерно большого числа камер для описания фармакокинетики ЛВ зачастую не является оправданным, так как при этом не удаётся определить изменение концентрации вещества в каждой из камер. Поэтому на практике редко используют более чем двух- или трёхкамерные модели.

Схема простейшей двухкамерной модели приведена на рис. 2.14. При этом предполагается, что ЛВ массой M одномоментно вводится в камеру 1. Из камеры 1

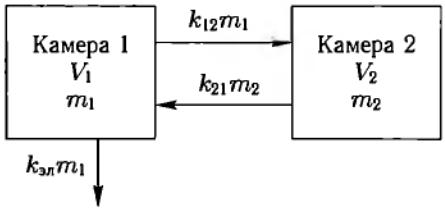


Рис. 2.14. Схема простейшей двухкамерной фармакокинетической модели

в камеру 2 ЛВ поступает за счёт массопереноса, скорость которого пропорциональна количеству вещества в камере 1. Кроме того, ЛВ элиминируется из камеры 1. Скорость элиминации меньше, чем скорость массопереноса. Из камеры 2 ЛВ поступает в камеру 1 также при помощи массопереноса.

Заметим, что ЛВ может оказывать терапевтическое воздействие как в камере 1, так и в камере 2. В случае, если ЛВ оказывает физиологическое воздействие в камере 1, камера 2 является «резервуаром» («депо») для ЛВ. В качестве такого «депо» могут выступать печень, альбумины крови и др. Однако наиболее часто ЛВ вводится в камеру 1, а действует в камере 2. В этом случае в качестве камеры 1 может выступать кровь, в качестве камеры 2 — интерстициальная жидкость.

Запишем закон действующих масс для двухкамерной модели, представленной на рис. 2.14:

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{dt} &= -(k_{эл} + k_{12})m_1 + k_{21}m_2, \\ \frac{dm_2}{dt} &= k_{12}m_1 - k_{21}m_2, \\ m_1(0) &= M, \quad m_2(0) = 0. \end{aligned} \tag{10}$$

Можно показать, что решение уравнений (10) записывается следующим образом:

$$\begin{aligned} C_1(t) &= \frac{m_1}{V_1} = A_1 \exp(-\alpha t) + A_2 \exp(-\beta t), \\ C_2(t) &= \frac{m_2}{V_2} = B\,(\exp(-\beta t) - \exp(-\alpha t)), \end{aligned} \tag{11}$$

где

$$A_1 = \frac{\alpha - k_{21}}{V_1(\alpha - \beta)}M, \quad A_2 = \frac{k_{21} - \beta}{V_1(\alpha - \beta)}M, \quad B = \frac{k_{21}}{V_1(\alpha - \beta)}M,$$
$$\alpha + \beta = k_{эл} + k_{12} + k_{21}, \quad \alpha\beta = k_{эл}k_{21}, \quad \alpha > \beta.$$

Как следует из (11), концентрация вещества в камере 2 изменяется аналогично случаю однокамерной модели со всасыванием ЛВ. Поэтому, если в эксперименте измеряют концентрацию ЛВ камере 2, то параметры фармакокинетической модели определяются методами, рассмотренными выше.

В случае, если концентрация ЛВ в камере 2 определяется по результатам изменения концентрации вещества в камере 1, то, как следует из (11), вычисляемая в этом случае концентрация C_2 является «фиктивной» (кажущейся), которая связана с истинным значением концентрации $C_{ист}$ следующим соотношением:

$$C_2 = \frac{V_2}{V_1} C_{ист}.$$

Поэтому величину V_2 по результатам измерения концентрации вещества в камере 1 определить невозможно.

В случае, если концентрацию ЛВ определяют в камере 1, она складывается из двух экспонент: быстрой (с показателем α) и медленной (с показателем β). Вначале определяют параметры медленной экспоненты. Для этого в полулогарифмических координатах проводят абсциссу к конечным участкам графика вплоть до точки пересечения с осью ординат, равной $\ln A_2$ (рис. 2.15, *а*). Величину β определяют по тангенсу угла наклона касательной к конечным участкам графика (см. рис. 2.15, *а*). После этого из всех значений концентраций вычитают величину $A_2 \exp(-\beta t)$ для каждого из времён, для которого производилось измерение (рис. 2.15, *б*). Вычисленные величины содержат информацию только об одной экспоненте, $A_1 \exp(-\alpha t)$. Её параметры находятся аналогично тому, как это было описано для простейших однокамерных фармакокинетических моделей без всасывания.

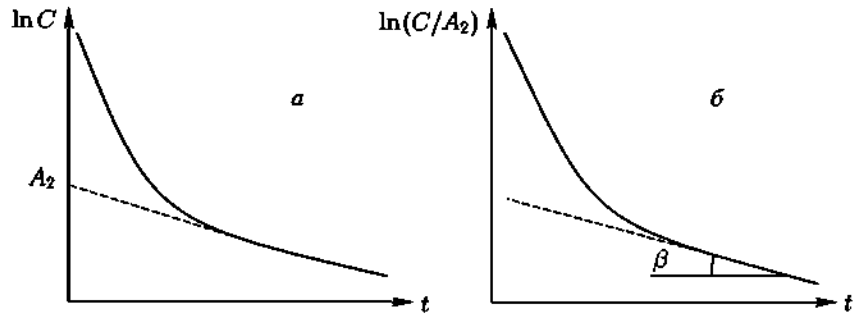


Рис. 2.15. Определение параметров медленной экспоненты для двухкамерной фармакокинетической модели

Следует заметить, что для правильного определения параметров экспонент необходимо не менее 4–5 экспериментальных точек на каждую экспоненту.

Пример. В работе [7] изучали фармакокинетику гентамицина в сыворотке крови кошки после внутривенного введения препарата. Результаты эксперимента приведены в табл. 2.3. Определить параметры фармакокинетической модели.

Таблица 2.3

Фармакокинетика гентамицина после внутривенного введения

Время, мин	ln (измеренная концентрация, мкг/мл)	ln (вычисленная концентрация, мкг/мл)
10	1,7	1,2
20	1,4	0,7
30	1,1	0,1
40	0,7	−1,7
50	0,5	*
60	0,45	*
80	0,35	*
100	0,25	*
120	0,15	*
150	0,05	*

* Значения не вычислялись.

Вначале определим параметры медленной экспоненты. Для этого в полулогарифмических координатах проведём асимптоту к конечным участкам графика. Точка пересечения этой асимптоты с осью ординат даст значение $\ln A_2 = 0{,}8$ (рис. 2.16, *а*). Следовательно, $A_2 = 2{,}2$. По тангенсу угла наклона асимптоты, полученной при больших t, определяем значение $\beta = 0{,}0046$ мин$^{-1}$ (рис. 2.16, *а*). Вычитаем из измеренной концентрации величины $A_2 \exp(-\beta t)$ (столбец «вычисленная концентрация», табл. 2.3). Невычисленные значения соответствуют медленной экспоненте. Для вычисленной концентрации C_p строим график в полулогарифмических координатах (рис. 2.16, *б*). По точке пересечения асимптоты с осью ординат находим $A_2 = 12{,}2$.

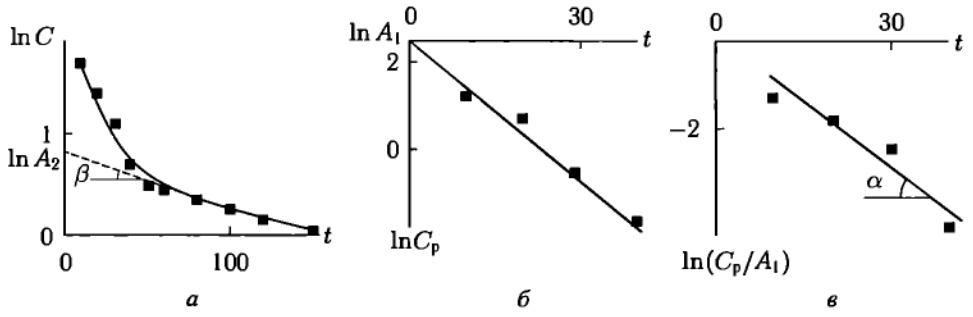


Рис. 2.16. Определение параметров двухкамерной фармакокинетической модели без всасывания

В координатах $(\ln(C_p/A_1), t)$ находим $\alpha = 0{,}094$ мин$^{-1}$ по тангенсу угла наклона касательной к графику (рис. 2.16, *в*).

2.4.8. Двухкамерные фармакокинетические модели со всасыванием. Наиболее сложным представляется случай двухкамерной модели со всасыванием (рис. 2.17, *б*). При этом предполагается, что ЛВ одномоментно поступает в резервуар

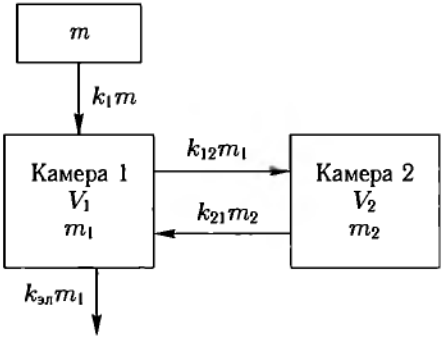


Рис. 2.17. Схема двукамерной фармакокинетической модели со всасыванием

(место введения), в качестве которого может выступать желудочно-кишечный тракт при пероральном введении, мышца или подкожно-жировая клетчатка при внутримышечном или подкожном введении и т. п. Закон действующих масс для рис. 2.17 запишется следующим образом:

$$\begin{aligned}
&\frac{dm}{dt} = -k_1 m, \quad m(0) = M,\\
&\frac{dm_1}{dt} = k_1 m - (k_{эл} + k_{12}) m_1 + k_{21} m_2, \quad m_1(0) = 0,\\
&\frac{dm_2}{dt} = k_{12} m_1 - k_{21} m_2, \quad m_2(0) = 0.
\end{aligned} \tag{12}$$

Можно показать, что решение для данной системы записывается так:

$$\begin{aligned}
C_1 &= A_1 \exp(-\alpha t) + A_2 \exp(-\beta t) - (A_1 + A_2) \exp(-k_1 t),\\
C_2 &= (B_1 + B_2) \exp(-k_1 t) + B_1 \exp(-\alpha t) + B_2 \exp(-\beta t).
\end{aligned} \tag{13}$$

Здесь параметры α и β связаны с константами скоростей следующими соотношениями:

$$\alpha + \beta = k_{эл} + k_{12} + k_{21}, \quad \alpha\beta = k_{эл}k_{21};$$

при $\alpha > \beta$.

Коэффициенты уравнения (13) определяют по формулам:

$$A_1 = \frac{k_1(\alpha - k_{21})}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M, \quad A_2 = \frac{k_1(k_{21} - \beta)}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M,$$

$$B_1 = \frac{k_1 k_{12}}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M, \quad B_2 = \frac{k_1 k_{12}}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M.$$

Параметры зависимости (13) определяют начиная с медленной экспоненты, описывающей процесс элиминации ЛВ. Затем рассчитывают параметры быстрой экспоненты, описывающей элиминацию. После этого определяют параметры экспоненты, описывающей поступление ЛВ. При этом для определения параметров каждой экспоненты используют не менее 4–5 точек. Типичный вид зависимости концентрации лекарственного вещества от времени для двухкамерной модели со всасыванием приведён на рис. 2.18.

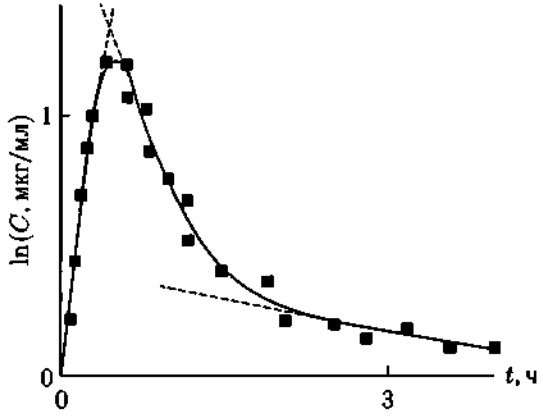


Рис. 2.18. Фармакокинетика метилатропина при подкожном введении [27]

2.4.9. Биологический смысл многокамерных моделей. С биологической точки зрения поступление ЛВ из одной камеры в другую есть процесс преодоления им гистогематического или иного тканевого и/или клеточного барьера.

Основные гистогематические барьеры:

— гематоэнцефалический;

— гематоофтальмический;

— капсулы предстательной железы и яичек.

Наиболее изучен гематоэнцефалический барьер, он же является основным (с точки зрения фармакокинетики), так как проницаемость ЛВ через гематоэнцефалический барьер означает наличие у них центральных эффектов. Если гематоэнцефалический барьер не проницаем для ЛВ, то у него отсутствуют центральные эффекты.

Гематоэнцефалический барьер осуществляет контроль поступления молекул из кровотока в центральную нервную систему (ЦНС) и цереброспинальную жидкость.

Он образован:

— эндотелиальными клетками сосудов головного мозга. Эти клетки соединены плотными контактами, которые ограничивают межклеточный транспорт. Характерная

особенность этих клеток — чёткая специализация базальной и латеральной мембраны, что делает их сходными с клетками эпителия;

— базальной мембраной;

— астроцитами;

— перицитами.

Таким образом, при поступлении из крови в ЦНС молекулам ЛВ приходится преодолевать не один, а несколько барьеров.

Через эти барьеры могут проникать:

— липофильные соединения;

— низкомолекулярные вещества (преимущественно неорганические ионы);

— ЛВ, имеющие специальные переносчики (транспортные системы).

Следует иметь в виду, что проницаемость гематоэнцефалического (как и любого другого гистогематического) барьера возрастает при его повреждении, например при травме, воспалении. Кроме того, отметим, что в ЦНС есть участки, лишённые гематоэнцефалического барьера, или участки, в которых имеется повышенная проницаемость барьера. Это — обонятельные нервы (отсутствие гематоэнцефалического барьера в области обонятельных нервов используется при интраназальном введении ряда ЛВ), дно желудочков мозга. Через эти участки осуществляется ограниченный транспорт части ЛВ, для которых гематоэнцефалический барьер непроницаем.

Однако основное значение для транспорта ЛВ в ЦНС имеют астроциты и клетки микроглии. Вероятно, они не только участвуют в специфическом переносе лекарственных веществ через гемато-энцефалический барьер, но и участвуют в регуляции его проницаемости, что позволяет увеличивать или уменьшать поступление ЛВ в ЦНС путём диффузии.

Выделяют следующие основные виды транспортёров, осуществляющих перенос ЛВ через гематоэнцефалический барьер:

— для монокрабоксильных аминокислот;

— для органических ионов;

— резистентные для большинства ЛВ.

Эти транспортёры являются насыщаемыми. Поэтому неограниченное повышение концентрации ЛВ в плазме крови приводит лишь к лимитированному увеличению его содержания в ЦНС.

2.4.10. Внутриклеточный транспорт лекарственных веществ. Большая часть ЛВ изменяет функционирование эфферентных клеток за счёт связывания со специфическими молекулами, рецепторами, расположенными на поверхности клеточной мембраны. После взаимодействия ЛВ с рецептором изменяется конформация последнего, что служит сигналом для активации целого ряда внутриклеточных молекул (так называемых вторичных мессенджеров), которые влияют на интенсивность различных внутриклеточных процессов.

Однако некоторые ЛВ сами могут транспортироваться в клетку и непосредственно изменять функции клетки. Так, например, эстрогены, поступая в клеточное ядро, могут взаимодействовать с ДНК, влияя тем самым на интенсивность процессов считывания РНК.

С формально-кинетической точки зрения, поступление ЛВ в клетки может описываться дополнительной камерой в фармакокинетической модели. Например, на рис. 2.14 камерой 1 может быть кровь, а камерой 2 — клетка или её компартменты.

Существует несколько основных путей транспорта ЛВ в клетки.

1. Свободная диффузия — характерна для липофильных ЛВ, идёт по градиенту концентрации без затрат энергии.

2. Облегчённая диффузия — наблюдается преимущественно у моносахаридов. Идёт по градиенту концентрации, однако перенос ЛВ через клеточную мембрану потенцируется клеточными макроэргическими соединениями (преимущественно АТФ).

3. Сопряжённый транспорт. Используется для обмена ЛВ, являющимися сахарами или аминокислотами, на внутриклеточные ионы (Na^+, K^+, Ca^{2+}). В процессе переноса участвуют АТФ-зависимые белки (пермиазы).

4. Транспорт через ионные каналы. Таким образом в клетку через ионные каналы поступают ЛВ, являющиеся неорганическими ионами. Так через натриевые и калиевые каналы поступают ионы лития, через кальциевые каналы — ионы магния.

5. Абсорбционный эндоцитоз. Наблюдается для ряда высокомолекулярных ЛВ, при этом молекулы ЛВ предварительно адсорбируются на поверхности клетки за счёт связывания с рецепторами или гликокаликсом клетки. После абсорбции ЛВ наблюдаются впячивание клеточной мембраны, образование пиноцитарного пузырька и транспорт адсорбированного ЛВ в составе этого пузырька в клетку.

После поступления ЛВ в клетку наблюдается его распределение по клеточным компартментам. К сожалению, данный процесс практически не изучен.

2.4.11. Нелинейные фармакокинетические модели. Несмотря на простоту и широкое использование, линейные фармакокинетические модели имеют ряд существенных ограничений. В частности, они не могут описывать процессы ферментативной деградации ЛВ. Как было показано выше, критерием того, что фармакокинетику ЛВ можно описать с помощью линейной модели, является возможность спрямления экспериментальных данных в полулогарифмических координатах. Если в этих координатах экспериментальные данные удаётся линеаризовывать, то фармакокинетику ЛВ можно описывать линейной моделью. В тех случаях, когда экспериментальные данные не описываются линейной многокамерной моделью, обычно используют нелинейные фармакокинетические модели. Типичный вид фармакокинетической кривой для нелинейной модели представлен на рис. 2.19, *а* (данные табл. 2.4).

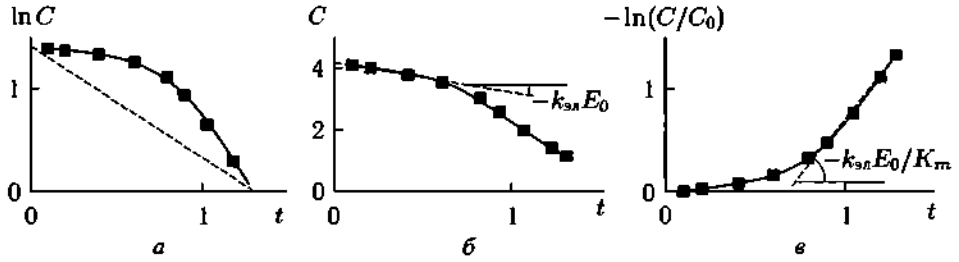


Рис. 2.19. Фармакокинетика алкоголя после внутривенного введения (нелинейная фармакокинетическая модель) [1]

Детально методы анализа нелинейных фармакокинетических моделей рассмотрены в литературе [3, 24]. Не останавливаясь подробно на них, мы упомянем наиболее типичный способ перехода к нелинейным моделям. Данный метод основан на предположении, что элиминация ЛВ осуществляется ферментом. Тогда скорость элиминации будет определяться уравнением Михаэлиса–Ментен:

$$V_{эл} = k_{эл}\frac{E_0 C}{K_M + C}, \qquad (14)$$

где E_0 — концентрация фермента, осуществляющего элиминацию ЛВ, концентрация которого равна C; K_M — константа Михаэлиса для этого фермента.

Таблица 2.4

Фармакокинетика алкоголя после его внутривенного введения

Время, ч	Концентрация, мкг/мл	Время, ч	Концентрация, мкг/мл
0,1	4,1	0,9	2,6
0,2	3,9	1,0	1,9
0,4	3,8	1,2	1,3
0,6	3,6	1,3	1,1
0,8	3,0		

Тогда в случае простейшей однокамерной модели уравнение (4) можно представить как

$$\frac{dC}{dt} = -k_{эл}\frac{E_0 C}{K_M + C},$$

$$\frac{K_M + C}{E_0 C}\,dC = -k_{эл}\,dt,$$

$$\frac{K_M}{E_0}\ln C + \frac{1}{E_0}C = -k_{эл}t + \frac{K_M}{E_0}\ln C_0 + \frac{C_0}{E_0}.$$

Данная модель имеет два принципиально разных режима функционирования:

1) $C \gg K_M$ — избыток концентрации субстрата по отношению к ферментативным системам расщепления;

2) $C \ll K_M$ — избыток ферментативных систем превращения по отношению к концентрации субстрата.

В режиме избытка концентрации алкоголя по отношению к ферментативным системам его расщепления ($C \gg K_M$) имеем:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{эл}E_0,$$

$$dC = -k_{эл}E_0\,dt,$$

$$C = C_0 - k_{эл}E_0 t.$$

Таким образом, в режиме $C \gg K_M$ начальный участок зависимости (C, t) линеен, при этом тангенс угла наклона равен $-k_{эл}E_0$.

Из рис. 2.19, *б* определяем: $k_{эл}E_0 = 1{,}0$ мкг/(мл · ч).

В режиме избытка ферментативных систем по отношению к концентрации алкоголя ($C \ll K_M$) закон действующих масс записывается так:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{эл}\frac{E_0 C}{K_M},$$

$$\frac{dC}{C} = -\frac{k_{эл}E_0}{K_M}\,dt,$$

$$\ln\frac{C}{C_0} = -\frac{k_{эл}E_0}{K_M}\,t.$$

Таким образом, в условиях $C \ll K_M$ при больших временах наблюдения за системой график зависимости $\left(\ln\dfrac{C}{C_0}, t\right)$ линеен, при этом тангенс угла наклона равен $-\dfrac{k_{эл}E_0}{K_M}$ (рис. 2.19, *в*). Из тангенса угла наклона находим $K_M = 2{,}0$ мкг/мл.

2.5. Биохимическая трансформация лекарственных веществ в организме

Выше мы рассмотрели принципы перехода от линейных фармакокинетических моделей к нелинейным, учитывающим ферментативную деградацию ЛВ в организме. Доказано, что ЛВ, способствуя восстановлению нормального течения и ритма физиологических функций, являются, так же как и любые другие ксенобиотики, чужеродными веществами для обычных метаболических путей живой клетки. Попав в организм, ЛВ преодолевает ряд физиологических тканевых барьеров и подвергается определённым метаболическим превращениям, в результате чего биологическая активность фармакологических препаратов может снижаться или полностью исчезать, а в некоторых случаях, наоборот, увеличиваться (табл. 2.5).

Таблица 2.5

Примеры биотрансформации лекарственных веществ в активные метаболиты

Исходное ЛВ	Активный метаболит
Аллопуринол	Аллоксантин
Амитриптилин	Нортриптилин
Ацетилсалициловая кислота	Салициловая кислота
Бутадион	Оксифенбутазон
Дезогестрел	3-кетодезогестрел
Диазепам	Дезметилдиазепам
Дигитоксин	Дигоксин
Кодеин	Морфин
Кортизон	Гидрокортизон
Метилдопа	Метилнорадреналин
Преднизон	Преднизолон
Новокаинамид	N-ацетилновокаинамид
Пропанолол	N-оксипропранолол
Спиронолактон	Канренон
Фенацетин	Ацетаминофен
Хлордиазепоксид	Дезметилхлордиазепоксид

Под биотрансформацией, или метаболизмом, понимают комплекс физико-химических и биохимических превращений ЛВ, в процессе которых образуются полярные водорастворимые вещества (метаболиты), которые легче выводятся из организма.

Установлено, что основные метаболические превращения ЛВ протекают в печени, хотя биотрансформация ксенобиотиков параллельно происходит в лёгких, плаценте, слизистой кишечника и в других органах. Как правило, чужеродные вещества или эндогенные субстраты превращаются в более полярные водорастворимые молекулы ферментами различных органелл клетки. Например, попадая в организм, толуол окисляется ферментами эндоплазматического ретикулума до бензилового спирта, который в цитоплазме окисляется до бензойной кислоты. Последняя, в свою очередь, соединяется с глицином. Образующийся бензоилглицин (гиппуровая кислота) хорошо растворим в воде и поэтому легко выводится с мочой.

Однако основная роль в биотрансформации лекарственных средств отводится ферментам эндоплазматического ретикулума клеток печени.

Развитие электронной микроскопии позволило исследователям в 1945 г. обнаружить в эндоплазме клеток вакуолярную систему, которая имеет вид ограниченных мембранных структур. В 1953 г. К. Р. Портер назвал эту структуру клетки эндоплазматической сетью, или ретикулумом. Это название осталось доминирующим в со-

временной литературе, хотя существует множество синонимов. Эндоплазматическая сеть тесно связана с выпячиванием клеточной оболочки в цитоплазму. Эргастоплазма сообщается с аппаратами Гольджи, окружает митохондрии. Из этого следует, что эндоплазматическая сеть представляет собой общую внутриклеточную систему, объединяющую все клеточные органеллы в единое целое, являясь динамическим скелетом клетки.

Установлено, что метаболические превращения лекарственных, канцерогенных, токсических веществ, а также эндогенных субстратов (гормонов) осуществляются ферментативными системами, локализованными в эндоплазматическом ретикулуме печёночных клеток. Одна из этих систем специфична к никотинамидоадениндинуклеотид-фосфату (НАД(Ф)Н), а другая — к никотинамидоадениндинуклеотиду (НАДН).

Суть реакций окисления, которые участвуют в детоксикации ядов и метаболизма некоторых эндогенных субстратов, состоит в гидроксилировании, т. е. во введении гидроксильной группы в структуру фармакологического препарата, что делает последний более полярным и облегчает выведение его почками. Гидроксильная группа может быть введена в молекулу в результате окисления, восстановления или гидролиза.

При помощи меченого кислорода было показано, что, во-первых, в реакциях гидроксилирования участвует молекулярный кислород воздуха, во-вторых, один атом кислорода восстанавливается до воды, а другой инкорпорируется в составе гидроксильной группы в молекулу метаболизируемого субстрата.

Процесс можно представить в виде следующего уравнения:

$$RH + НАД(Ф)Н + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + НАД(Ф) + H_2O,$$

где RH — фармакологический препарат.

Система микросомального гидроксилирования состоит, по меньшей мере, из двух каталитических компонентов: цитохрома Р-450 и флавопротеида. Последний катализирует восстановление этого цитохрома посредством $НДФН_2$ и называется НАД(Ф)Н-цитохром-Р-450-редуктазой. Некоторые авторы предполагают, что данный флавопротеид, помимо своей основной функции (переноса электронов в гидроксилирующей системе), может катализировать и некоторые оксигеназные и редуктазные реакции.

Цитохром Р-450 представляет собой фосфолипидпротогемсульфидпротеиновый комплекс, который в восстановленной форме имеет сродство к оксиду углерода. Своё название этот цитохром получил ввиду того, что в восстановленном состоянии он образует довольно прочный комплекс с CO, имеющий максимум поглощения при 450 нм.

По современным представлениям, роль цитохрома Р-450 заключается в связывании с субстратом, что ведёт, по-видимому, к изменению электронной структуры как самого цитохрома, так и субстрата. С другой стороны, цитохрому Р-450 отводится большая роль в активации молекулярного кислорода.

Механизм гидроксилирования включает пять основных стадий процесса. На первой стадии метаболизируемый субстрат связывается с окисленной формой цитохрома Р-450. Образующийся цитохром-субстратный комплекс обладает спектром поглощения, причём в зависимости от субстратов обнаруживаются спектральные изменения двух типов. Гексобарбитал, амидопирин, амобарбитал, фенобарбитал и др. вызывают спектральные изменения первого типа — максимум поглощения при 395–390 нм, минимум при 420–425 нм. Анилин, метапирин дают при связывании с цитохромом Р-450 второй тип спектральных изменений, похожий на зеркальное изображение первого, — с максимумом поглощения при 425–435 нм и минимумом при 390–400 нм.

Вторая стадия гидроксилирования заключается в восстановлении фермент-субстратного комплекса. Затем идёт образование тройного комплекса: восстановленный цитохром Р-450 — субстрат — кислород. Четвёртая стадия включает в себя активирование молекулярного кислорода в этом комплексе путём его восстановления. Завершается этот цикл распадом образовавшегося комплекса на окисленный цитохром Р-450, гидроксилированный продукт метаболизма и воду.

Круг реакций, осуществляемых ферментативными системами печени, широк.

НАД(Ф)Н-зависимые реакции

I. Окисление ксенобиотиков:

1) окислительное деалкилирование: N-деалкилирование; О-деалкилирование; S-деалкилирование;
2) гидроксилирование циклических соединений: гидроксилирование ароматических углеводородов; гидроксилирование циклических предельных углеводородов; гидроксилирование гетероциклических углеводородов;
3) гидроксилирование алифатических соединений: гидроксилирование алифатических предельных углеводородов (алканов); гидроксилирование алкильной боковой цепи;
4) N-окисление: образование М-оксидов; N-гидроксилирование;
5) окислительное дезаминирование;
6) S-окисление и десульфирование.

II. Окисление природных субстратов:

1) ω-окисление насыщенных жирных кислот;
2) гидроксилирование стероидов, желчных кислот и холестерина;
3) биосинтез простагландинов;
4) пероксидное окисление ненасыщенных жирных кислот;
5) гидропероксидазные реакции в микросомах.

III. Реакции восстановления:

1) восстановление нитросоединений;
2) восстановление азосоединений;
3) восстановительное дегалогенирование.

НАДН-зависимые реакции

I. Реакция десатурации насыщенных жирных кислот.

II. Восстановление семидегидроаскорбиновой кислоты.

III. Реакция гидроксилирования:

1) гидроксилирование кинуренина;
2) гидроксилирование фенолов и анилина.

Таким образом, эндоплазматический ретикулум клеток печени располагает набором различных ферментов, которые осуществляют метаболические превращения ЛВ.

2.5.1. Механизмы биотранформации лекарственных веществ в печени. Различают два типа реакций метаболизма лекарственных препаратов в организме: несинтетические (фаза I биотрансформации) и синтетические (фаза II биотрансформации). Несинтетические реакции метаболизма лекарственных препаратов можно разделить на две группы: катализируемые ферментами эндоплазматического ретикулума (микросомальные) и катализируемые ферментами другой локализации (немикросомальные). К несинтетическим реакциям относятся окисление, восстановление и гидролиз. В основе синтетических реакций лежит конъюнгация лекарственных средств с эндогенными субстратами (глюкуроновая кислота, сульфаты, глицин, глутатион, метильные группы, вода и др.). Соединение этих веществ с лекарственными препаратами происходит через ряд функциональных групп: гидроксильную, карбок-

сильную, аминную, эпоксидную. После завершения реакции молекула препарата становится более полярной и, следовательно, легче выводится из организма.

2.5.2. Фаза I биотрансформации. Реакции окисления. Цитохром-Р-450-зависимые реакции окисления (микросомальные реакции оксиления). В гепатоцитах наиболее полно представлен набор ферментных систем, осуществляющих окисление разнообразных ксенобиотиков. Микросомальному преобразованию подвергаются прежде всего жирорастворимые вещества, которые легко проникают через мембраны в эндоплазматический ретикулум и связываются с одним из цитохромов системы Р-446–Р-455 (зачастую по первому обнаруженному ферменту этой системы указывают только цитохром Р-450). Эти цитохромы — первичные компоненты окислительной ферментной системы. Скорость биотрансформации препаратов системой оксидаз смешанного типа определяется концентрацией цитохрома Р-450, количеством различных форм цитохрома Р-450 и их сродством к субстрату, концентрацией цитохром-С-редуктазы и скоростью восстановления комплекса препарат — цитохром Р-450. Скорость биотрансформации может зависеть и от конкурирования эндогенных и экзогенных субстратов. Схематично реакция может быть записана следующим образом:

$$RH + O_2 \xrightarrow[\text{P-450}]{2H^+,\,2\bar{e}} ROH + 2H_2O.$$

ЛВ могут как повышать, так и снижать активность микросомальных ферментов (табл. 2.6 и 2.7). Существует большая группа веществ, включающихся в печёночный метаболизм, активирующих, подавляющих и даже разрушающих цитохром Р-450.

Таблица 2.6

Некоторые индукторы микросомального окисления

Нейротопные средства	Антибиотики	Стероиды
Барбитураты Трициклические антидепрессанты Диазепам Фенитоин Хлоримипрамин Карбамазепин	Рифампицин	Спиронолактон

К числу последних относятся ксикаин, совкаин, бенкаин, индерал, вискен, эралдин и др. Более значительной является группа веществ, индуцирующих синтез ферментативных белков печени, по-видимому с участием НАД(Ф)H_2-цитохром-Р-450-редуктазы, цитохрома Р-420, N- и О-деметилаз микросом, ионов Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}. Это гексобарбитал, фенобарбитал, пентобарбитал, фенилбутазон, кофеин, этанол, никотин, бутадион, нейролептики, амидопирин, хлорциклизин, димедрол, мепробамат, трициклические антидепрессанты, бензонал, хинин, кордиамин, многие хлорсодержащие пестициды. Показано, что в активации этими веществами ферментов печени участвует глюкуронилтрансфераза. При этом возрастает синтез РНК и микросомальных белков. Индукторы усиливают не только метаболизм ЛВ в печени, но и их выведение с желчью. Причём ускоряется метаболизм не только вводимых вместе с ними лекарственных препаратов, но и самих индукторов.

Цитохром Р-450 преимущественно представлен в печени, он является гетерогенным ферментом, его суперсемейства обозначают как CYP (Cytochrome P), помечая буквами и цифрами, например CYP3A3-5. Для генов, кодирующих цитохром Р-450, характерен большой полиморфизм. Дебризохвин, гипотензивное средство, которое

Таблица 2.7

ЛВ, биотрансформация которых усиливается под влиянием некоторых индукторов ферментов

Фенобарбитал	Рифампицин	Фенитоин
Аминазин	Варфарин	Гидрокортизон
Антипирин	Гептобарбитал	Дексаметазон
Варфарин	Гидрокортизон	Дигитоксин
Гидрокортизон	Гликодиазин	Дикумарин
Гризеофульвин	Дапсон	Тироксин
Диазепам	Дигитоксин	Фенитоин
Дигитоксин	Метабон	
Дикумарин	Норэтилстерон	
Нитроглицерин	Рифампицин	
Пероральные контрацептивы	Толбутамид	
Рифампицин		
Тестостерон		
Фенитоин		
Фенобарбитал		
Хинин		

в настоящее время практически не применяется, был первым препаратом, для которого было доказано наличие индивидуальных генетических особенностей метаболизма, протекающего с участием цитохрома Р-450: показано, что у 10% людей белой расы скорость метаболизма препарата снижена. Обнаружено, что такая особенность метаболизма связана с рецессивной мутацией, приводящей к снижению активности дебризохинолин-гидроксилазы (CYP2D6). Множество ЛВ метаболизируется с участием этого фермента; кроме того, ряд ЛВ может повлиять на этот метаболизм (рис. 2.20).

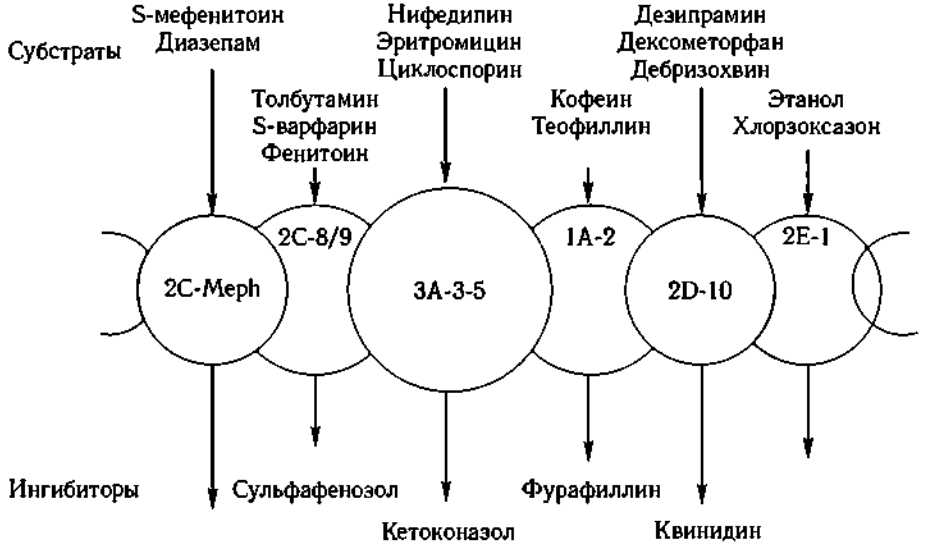


Рис. 2.20. Графическое представление различных изоформ цитохрома Р-450 у человека (кружки). Пересечения кружков означают перекрёстную субстратную специфичность. Стрелки показывают метаболические пути

Аналогичные данные для другого фермента, относящегося к суперсемейству цитохрома Р-450, CYP3A4, приведены в табл. 2.8.

Таблица 2.8

Лекарственные средства, взаимодействующие с изоферментом CYP3A4

Группа лекарственных средств	Субстраты	Индукторы	Ингибиторы
Антибиотики	Эритромицин Кларитромицин Рифампицин	Рифампицин	Эритромицин Кларитромицин Ципрофлоксацин Норфлоксацин
Антиретровирусные средства	Индинавир Нелфинавир Ритонавир Саквинавир	Ифавиренц Невирапин	Делавиридин Индинавир Нелфинавир Ритонавир Саквинавир
Противогрибковые средства	Кетоконазол Интраконазол		Кетоконазол Интраконазол Флуконазол
Антиаритмические средства	Хинидин Лидокаин		Амиодарон
Антагонисты кальция	Амлодипин Дилтиазем Фелодипин Лерканидипин Нифедипин Нисолдипин Нитрендипин Верапамил		Дилтиазем Мибефрадил Верапамил
Ингибиторы АПФ	Эналаприл		
Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы	Аторвастатин Церивастатин Ловастатин Симвастатин		
Антикоагулянты	Варфарин		
Бензодиазепины	Алпрозалам Диазепам Мидазолам Триазолам		
Противосудорожные и снотворные средства	Золпидем	Карбамазепин Фенитоин Барбитураты	
Нейролептики и антидепрессанты	Галоперидол (частично) Пимозид Тразодон		Флувоксамин
H_1-гистаминоблокаторы	Астамизол Терфеназин		
H_2-гистаминоблокаторы			Циметидин

Таблица 2.8 (*окончание*)

Группа лекарственных средств	Субстраты	Индукторы	Ингибиторы
Противодиабетические средства		Пиоглитазон Троглитазон	
Стероиды	Гидрокортизон Прогестерон Эстрадиол Тестостерон Финастерид	Глюкокортикоиды	
Иммуномодуляторы	Циклоспорин Такролимус		
Стимуляторы моторики ЖКТ	Цизаприд		
Опиоидные анальгетики	Кодеин Метадон Фентанил		
Противоопухолевые средства	Тамоксифен Паклитексел (частично) Винкристин	Глюкокортикоиды	
Другие	Пропранолол	Зверобой	Грейпфрутовый сок
	Салметерол		
	Декстраметорфан		
	Кокаин		
	Кофеин		
	Хинин		
	Теофиллин		
	Силденафил		
	Дапсон (частично)		

При низкой скорости метаболизма ЛВ основным ферментом может наблюдаться его перекрёстная (альтернативная) утилизация другим ферментом (рис. 2.21), что в ряде случаев приводит к появлению токсических соединений.

В результате изменения скорости и/или направления метаболизма наблюдается изменение клиренса ЛВ, повышается его концентрация в плазме крови, увеличивается время полувыведения, возрастает риск развития токсических осложнений при лекарственной терапии. Если больному одновременно назначается несколько ЛВ, метаболизирующихся с участием цитохрома Р-450, то вероятность развития токсических осложнений лекарственной терапии возрастает в несколько раз.

2.5.3. Основные типы реакций превращения лекарственных веществ в эндоплазматическом ретикулуме печени. *С-гидроксилирование алифатических соединений*, осуществляемое микросомальными ферментами печени, можно представить следующим образом:

$$RCH_3 \rightarrow RCH_2OH.$$

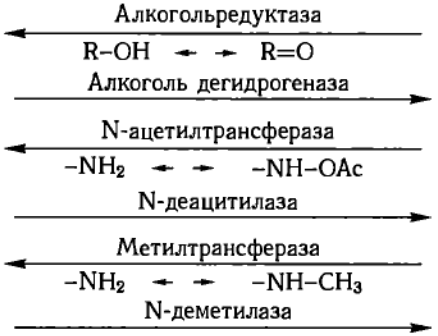


Рис. 2.21. Примеры альтернативных путей метаболизма лекарственных веществ

Обычными субстратами в этих реакциях служат боковые цепи барбитуратов. Данная реакция протекает на цитохроме Р-450 в присутствии кислорода. Боковая цепь барбитуратов и других ЛВ окисляется ферментами эндоплазматического ретикулума печени до первичных и вторичных спиртов. Эта реакция может ингибироваться типичными ингибиторами цитохрома Р-450 (SKF-525A, CO и др.) и индуцироваться фенобарбиталом. Гексобарбитал относится к барбитуратам короткого действия; в организме, помимо гидроксилирования, он дезактивируется N-деметилированием и разрывом барбитурового кольца.

С-гидроксилирование ароматических соединений. Ароматическое гидроксилирование приводит к образованию соединений фенольного типа в результате включения гидроксильной группы в ароматическое кольцо бензола, полициклических углеводородов, гетероциклических соединений и их производных. Типичные субстраты гидроксилируются почти исключительно в пара-положении (90 %), не более 10 % продукта гидроксилируется в орто-положении. Если же полициклические ароматические углеводороды не содержат в кольце заместитель, то они могут гидроксилироваться в разных положениях. Реактивность кольца в значительной степени влияет на скорость гидроксилирования ароматических субстратов и на положение вводимой ОН-группы. Большинство полициклических углеводородов имеет две характерные области реактивности: К-область — наиболее реакционное место, по которому происходит связывание с тканями, и Л-область, место вторичной реактивности, по которому обычно происходит гидроксилирование.

Окислительное деалкилирование. Потеря лекарственным веществом в организме алкильных групп называется процессом деалкилирования. Наиболее часто эти группы отщепляются от атомов кислорода, азота или серы, что приводит соответственно к понятиям О-, N- и S-деалкилирования:

$$ROC_2H_5 \rightarrow ROH + CH_3CHO,$$

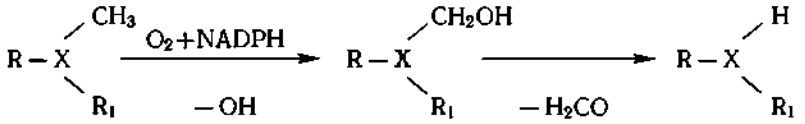
$$RNHCH_3 \rightarrow RNH_2 + HCHO,$$

$$RSCH_3 \rightarrow RSH + HCHO.$$

Основным путём метаболизма вторичных и третичных аминов является N-деметилирование с образованием в качестве конечных продуктов альдегида и соответствующего амина.

О- и N-деалкилирование — процессы, наиболее общие для многих лекарств и ядов, в результате которых фармакологическая активность веществ может либо уменьшаться, либо повышаться.

Установлено, что практически любой анальгетик подвержен в организме N-деметилированию. Наиболее интенсивно эти процессы протекают в печени, и особенно в микросомальной фракции, в присутствии НАД(Ф)H_2 и O_2, хотя N-деметилирующая активность имеется и в других органах и фракциях, но она значительно слабее, чем в микросомальной фракции печени. N-деалкилироваться могут метиламфетамин, меперидин, метиланилин, диацетилморфин (героин), метадон, кодеин и другие вещества. Первоначально атмосферный кислород «атакует» углерод N-алкильной группы (С-окисление) с образованием N-оксиалкильного промежуточного продукта, который быстро разрушается с образованием формальдегида и амина. Скорость деметилирования аминов находится в прямой зависимости от способности их растворяться в липидах. Реакция деалкилирования по своему механизму является, по-видимому, реакцией гидроксилирования и протекает по схеме:



где X — N, S или O.

Как видно, промежуточная стадия включает гидроксилирование. Реакция требует восстановленных кофакторов и O_2 и осуществляется по механизму «оксидаз смешанного действия». Кислород, активируемый цитохромом P-450, гидроксилирует метильную группу с образованием нестабильного промежуточного метаболита, который распадается на соответствующий норметаболит и формальдегид.

Основные процессы метаболизма связаны с N-деметилированием, однако в микросомах могут идти реакции N-деэтилирования, N-депропилирования, N-дебутилирования; но эти реакции играют незначительную роль в метаболизме ксенобиотиков.

Анальгезирующее и жаропонижающее действие фенацетина зависит от превращения его в N-ацетил-*п*-аминофенол, который применяют как самостоятельное лекарственное средство под названием парацетамола.

Обезболивающее действие кодеина связано с деметилированием его в морфин. О-деметилированию в микросомах печени подвергаются также папаверин, колхицин, мескалин и др.

При сравнительном изучении токсических свойств наркотиков и их норметаболитов найдено, что деалкилирование приводит к увеличению токсичности последних, главным образом в отношении конвульсативной активности. Например, норкодеин оказался в шесть раз токсичнее кодеина и в два раза токсичнее морфина при одинаковых условиях введения.

Дезаминирование характеризуется отщеплением аминогрупп от молекул фармакологических препаратов. Роль этого процесса в организме трудно переоценить, так как дезаминирование приводит к полной потере биологической активности многих фармакологических препаратов:

$$RCH(NH_2)CH_3 \rightarrow RCOCH_3 + NH_3.$$

Окислительному дезаминированию в микросомах печени подвергаются также серотонин, гистамин, адреналин, норадреналин и др. На примере разобранных реакций можно сделать заключение, что в печени имеется достаточно полный набор ферментов, способных метаболизировать широкий круг ЛВ и ядов, попавших в организм. Сущность этих реакций состоит в детоксикации, т. е. в изменении химической структуры и превращении чужеродных веществ из липидорастворимых в более

водорастворимые, что способствует скорейшему выведению их из организма. Однако указанные реакции часто являются лишь начальной, первой фазой метаболизма.

N-деалкилирование — частный случай гидроксилирования, при помощи этой реакции преимущественно осуществляется детоксикация аминов и альдегидов. Формирование большинства ферментных систем, участвующих в N-деалкилировании ксенобиотиков, происходит в постнатальном периоде развития. К ЛВ, для которых ферментативные системы N-деалкилирования формируются только в постнатальном периоде, относятся амидопирин, кофеин, диазепам, этилморфин, имипрамин, лидокаин и др. Применение этих ЛВ в раннем детском возрасте приводит к их извращённому метаболизму и преобладанию побочных эффектов над терапевтическими.

Дегидрогенация. Наиболее важным ферментом, осуществляющим до 75% реакций дегидрогенации в печени, является алкогольдегидрогеназа. Примерно 25% реакций дегидрогенации осуществляется специальными микросомальными ферментами.

Алкогольдегидрогеназа представлена преимущественно в печени, её активность существенно возрастает в постнатальном периоде развития. Показано, что для этого фермента существует очень узкий pH-оптимум, поэтому при развитии ацидозов или алкалозов его активность резко снижается.

Алкогольдегидрогеназа осуществляет гидролиз спиртов. Показано наличие субстратной индукции фермента, т. е. при длительной стимуляции субстратом при хроническом алкоголизме наблюдается активация ферментативной активности.

Другие реакции. Очень большое значение имеют реакции восстановления кольца пиридина. Эти реакции осуществляет фермент А-редуктаза. Его активность чрезвычайно мала во время эмбрионального развития. Этот фермент является ключевым в метаболизме стероидных соединений.

Фермент нитроредуктаза осуществляет инактивацию ряда нитросоединений, в частности нитрофуранов. Его активность чрезвычайно мала в эмбриональном периоде развития.

Гидролиз эфиров осуществляется эстеразами. Активность большинства эстераз возрастает в постнатальный период развития.

2.5.4. Фаза II биотрансформации. Во вторую фазу биотрансформации происходит биосинтез молекулы, которая способна выводиться из организма с жёлчью. Биосинтетические реакции включают: образование комплекса с глюкуроновой кислотой, сульфатом, ацетатом, глицином, гликозилирование и другие реакции.

Наиболее активно в печени протекают биосинтетические реакции, связанные с образованием комплекса с глюкуроновой кислотой. Существует по меньшей мере 4 типа реакций, которые приводят к образованию подобных комплексов.

1. Образование эфирной связи с OH-группой. Примерами ксенобиотиков, которые вступают в эту реакцию, являются аминофенол, нитрофенол, фенофталеин и др.
2. Образование N-гликозидной связи с аминами или иминами.
3. Образование S-гликозидной связи с SH-группой.
4. Образование эфирной связи с карбоксильной группой.

Биосинтетические реакции образования комплексов с глюкуроновой кислотой протекают с участием класса разнообразных ферментов, глюкуронилтрансфераз. Активность части этих ферментов уже достаточно высокая даже в эмбриональном периоде развития, часть других ферментов приобретает свою активность только в постнатальный период развития (табл. 2.9) Показано наличие субстратной индукции глюкоронилтрансфераз.

Реакции гликозилирования протекают аналогично реакциям образования комплексов с глюкуроновой кислотой, с той лишь разницей, что просиходит образование

Таблица 2.9

Формирование глюкоронилтрасферазной активности

Субстрат	Период формирования
Аминофенол, нитрофенол	Поздний эмбриональный
Салицилаты, оксазепам, хлорамфеникол, морфин	Неонатальный

комплекса с некоторыми сахарами (глюкозой, ксилозой и др.). Эти реакции не играют существенной роли в метаболизме большинства ЛВ.

Реакции конъюгации ксенобиотиков с глютатионом позволяют защищать гепатоциты от электрофильных соединений. Эти реакции катализируются глютатионтрасферазами. Образующиеся эфиры выделяются с жёлчью или подвергаются дальнейшему метаболизму и выводятся с мочой. Примером ксенобиотика, вступающего в реакцию конъюгации с глютатионом, может служить парацетамол.

В реакции конъюгации с сульфатом вступают некоторые ароматические соединения, спирты и амины. Интересно отметить, что в эмбриональный период развития сульфатированию подвергаются некоторые стероиды. Все ферменты, принимающие участие в реакции, являются цитозольными.

Реакция конъюгации с ацетатом катализируется ферментом N-ацетилтрасферазой. Ацилируются ароматические группы ксенобиотиков. Имеется генетическая вариабельность ацилирования, которая впервые была показана для противотуберкулёзного препарата изониазида в 1960 г. Обнаружено, что через 6 ч после введения препарата *per os* распределение его концентраций в плазме крови является полимодальным. При этом если взять кровь через 2 ч после перорального введения препарата, то распределение его концентраций будет мономодальным, т. е. имеются индивидуальные особенности метаболизма, а не всасывания изониазида.

Конъюгация способствует детоксикации, так как в результате этого процесса происходят большие изменения в свойствах ЛВ или яда. Двумя определяющими свойствами биологически активных молекул являются присущие им биохимическая активность и липидная растворимость. Первое свойство обычно зависит в большей степени от структуры; следовательно, конъюгация должна приводить к потере активности. Известно, что липидорастворимые вещества могут проходить через мембрану посредством пассивной диффузии. В результате же конъюгации формируются ионы, которые из-за своего заряда и объёмных гидратных оболочек имеют иную мобильность в ткани.

Уридин-5-дифосфо-D-глюкуроновая кислота функционирует в качестве донора D-глюкупиранирониловой группы для многих субстратов. Реакция катализируется рядом трансфераз.

N-глюкурониды могут быть образованы из ароматических аминов, транквилизаторов, таких как мепробамат, от вторичных аминов, например сульфаниламидов.

2.5.5. Роль лекарственных веществ в изменении ферментативной активности метаболизирующей системы эндоплазматического ретикулума печени. Как было уже сказано, продолжительность и интенсивность действия многих ЛВ зависят от скорости их метаболизма в эндоплазматическом ретикулуме печени. В то же время активность метаболизирующих ферментов зависит от диеты, колебания гормонального фона организма, действия фармакологически активных препаратов. При введении некоторых фармакопрепаратов активность ферментов метаболизма возрастает. Подобное увеличение активности многие исследователи связывают с возрастанием синтеза ферментативного белка, получившим название «ферментативная индукция».

Известно более сотни ксенобиотиков, увеличивающих активность гидроксилазной системы. К ним относятся различные ЛВ, канцерогены, инсектициды и другие химические соединения. Индукция приводит к увеличению уровня цитохрома Р-450, повышению активности НАД(Ф)Н-цитохром-С-редуктазы, ускорению метаболизма многих ЛВ и т. д. Также отмечаются изменения обоих типов спектров, характеризующих процесс связывания ЛВ микросомами. Причём увеличение содержания микросомального белка обусловлено не только его ускоренным синтезом, но и замедленным разрушением при введении индуктора.

При электронно-микроскопическом исследовании было установлено, что введение животным фенобарбитала, ДДТ, хлордана и других веществ даёт значительную пролиферацию гладких мембран эндоплазматического ретикулума, а на шероховатый ретикулум влияет незначительно.

При введении индукторов наблюдается увеличение также и цитохрома b_5, но уровень этого цитохрома увеличивается медленно и незначительно. Поэтому трудно провести корреляцию между увеличением цитохрома b_5 и изменением гидроксилазной активности. Одновременно происходит параллельное увеличение цитохрома Р-450 и интенсивности превращения лекарств.

Большинство изученных индукторов можно разделить на два типа: индукторы типа фенобарбитала и типа 3-метилхолантрена. Индукторы первого типа индуцируют большее количество путей метаболизма в эндоплазматическом ретикулуме печени (ароматическое гидроксилирование, алифатическое гидроксилирование, О- и N-деалкилирование и др.), а индукторы типа 3-метилхолантрена индуцируют значительно меньше реакций.

М-деметилирующая способность микросом из печени интактных и получивших фенобарбитал крыс ингибируется SKF-525A, в то время как ферменты микросом животных, получавших 3-метилхолантрен, сохраняют свою активность при воздействии данным препаратом. Это свидетельствует о различных механизмах индукции данными субстратами.

Определённый интерес представляет проблема субстратной специфичности системы гидроксилирования. Исследователей давно интересует вопрос — принимает ли участие в гидроксилировании ЛВ один и тот же цитохром Р-450 или существуют различные виды цитохрома Р-450, каждый из которых специфичен для данного соединения или группы соединений? Если правомерным оказывается второе предположение, то возникает новый вопрос, восстанавливаются ли различные виды цитохрома Р-450 одной общей НАД(Ф)Н-цитохром-Р-450-редуктазой или каждый вид имеет свою редуктазу?

Как уже было сказано, полициклические гидрокарбоны действуют более селективно на активность ферментативной системы, метаболизирующей лекарства. Так, 3-метилхолантрен по сравнению с фенобарбиталом увеличивает метаболизм меньшего числа субстратов, а уровень НАД(Ф)Н-цитохром-С-редуктазы остаётся неизменным.

Тщательное изучение спектров связывания цитохрома с СО показало, что абсорбционный максимум у крыс, получавших фенобарбитал, идентичен спектру контрольных крыс — 450 нм, в то время как введение 3-метилхолантрена приводит к сдвигу спектра в область 448 нм.

Было показано, что различные фармакологические агенты конкурентно ингибируют гидроксилирование друг друга, будучи добавленными к микросомам печени, инкубационная среда которых содержала избыток НАД(Ф)Н и кислорода.

В результате индукции микросмальных ферментов под действием фенобарбитала в печени животных возрастает биотрансформация тестостерона, эстрадиола, прогестерона, кортизола и альдостерона в полярные метаболиты. При одновременном

введении фенобарбитала и гормонов, несмотря на активацию микросомальных ферментов, метаболизм гормонов *in vivo* подавляется. Если же гормон вводится через определённое время после инъекции фенобарбитала, то его биотрансформация значительно превышает контрольный уровень. Из этого следует, что повышенная способность микросомальных ферментов печени трансформировать стероидные гормоны реализуется только после того, как метаболизирована значительная часть индуктора, и что причиной этому является конкурентное взаимодействие фенобарбитала и гормонов в системе гидроксилирования.

Итак, из сказанного ясно, что ЛВ не только метаболизируются микросомами печени, но и играют существенную роль в изменении ферментативной активности систем, метаболизирующих ксенобиотики.

Процессы биотрансформации ЛВ в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени играют определённую роль при химиотерапии. Следовательно, от активности микросомальных ферментов зависит судьба циркулирующих в организме препаратов и их метаболитов. В свою очередь, действие лекарств тесно связано с особенностями их химической структуры: даже незначительные вариации в структуре и функциональных заместителях приводят к существенному изменению биологической активности молекул. Химическая структура ЛВ определяет физико-химические свойства молекул: их основность, полярность, гидрофобность, липофильность, поверхностную активность и др.

Эти свойства, как известно, влияют на процессы всасывания, транспорта, распределения веществ в тканях организма, ассоциацию с рецепторными молекулами и т. п.

Таким образом, необходимо изучать трансформацию лекарственных препаратов в организме, чтобы использовать эти знания для более эффективного применения ЛВ при лечении различных патологических состояний.

2.5.6. Индивидуальные основы биотрансформации лекарственных веществ. Генетические особенности фармакокинетики. В результате многочисленных исследований было обнаружено, что фармакодинамика и фармакокинетика ЛВ в организме человека имеют возрастные, половые и другие особенности. При этом переносимость ЛВ у разных больных отличается, причём, как правило, определяющим фактором в индивидуальной чувствительности к фармакологическим воздействиям является наследственность. Фармакогенетика изучает индивидуальные особенности метаболизма и распределения ЛВ в организме, определяемые на генетическом уровне, которые задают биологический базис индивидуальной чувствительности к фармакологической терапии. Основные задачи фармакогенетики — изучение индивидуальной вариабельности ответа на введение ЛВ и предсказание особенностей индивидуального ответа.

Как правило, особенности распределения и выведения ЛВ связаны с мутациями генов, кодирующих ферменты, метаболизирующие ЛВ. При этом снижается или содержание фермента, или его активность. Гены, ответственные за проявления тех или иных особенностей, могут быть рецессивными и доминантными. Если ген является доминантным, то фенотипические особенности проявляются как у гомозигот, так и у гетерозигот; если ген является рецессивным, то эти особенности проявляются только у гомозигот. При этом большинство генов отличается полиморфизмом; некоторые особенности фармакокинетики и фармакодинамики ЛВ определяются не одним, а несколькими генами. В табл. 2.10 приведены примеры индивидуальных особенностей метаболизма и распределения ЛВ в организме человека, которые определяются на генетическом уровне.

Таблица 2.10

Некоторые генетические особенности, определяющие фармакокинетику и фармакодинамику лекарственных веществ

Биохимическая особенность	Клинические проявления	Ключевой фермент, рецептор и другие клеточные структуры	Частота встречаемости	Лекарственное вещество
Медленное гидроксилирование дебризоквинов	При замедлении метаболизма возможно развитие токсических эффектов	CYP2D6	5–10 % — кавказцы 3,8 % — негры 1 % — арабы 0,9 % — азиаты	Буфуронол, кодеин, метопролол, декстрометопран, дебризоквин
Медленное гидроксилирование S-мефенитоина	При замедлении метаболизма возможно возрастание седативного эффекта	CYP2C	16 % — азиаты 3–5 % — кавказцы	Диазепам
Быстрое или медленное ацилирование изоцианида	При медленном ацилировании возможно развитие токсических эффектов	N-ацетилтрансфераза	59 % — жители южных районов Индии, 58,6 % — кавказцы, 54,6 % — негры, 22 % — китайцы 12 % — японцы 10,5 % — эскимосы	Клоназепам, гидралазин, фенелзин, промизол, сульфаметазин, сульфасалазин
Медленный гидролиз сукцинилхолина	Нарушения дыхания	Холинэстераза плазмы крови (псевдохолинэстераза)	1 на 2500 чел. в мире: 10 % — евреи 7 % — словаки 2,5 % — жители южной Индии	Сукницилхолин
Лекарственная гемолитическая анемия	Гемолиз в ответ на введение ряда ЛВ	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Примерно 100 млн чел. в мире, чаще встречается в районе эпидемического распространения малярийного плазмодия	Ацетанилид, нитрофунганы, хлорамфениколы и др.

Таблица 2.10 (*окончание*)

Биохимическая особенность	Клинические проявления	Ключевой фермент, рецептор и другие клеточные структуры	Частота встречаемости	Лекарственное вещество
Снижение скорости метаболизма перекисей и гидроперекисей	Изъязвление дёсен, альвеолярная гангрена, атрофия дёсен, выпадение зубов	Каталаза	Описано более 100 больных в мире	Перекись водорода, спирты
Замедление скорости возбуждения K^+-каналов	Чрезмерное удлинение интервала *QT*	K^+-каналы сердца	Нет данных	Цизаприд, десипрамин, эритромицин, галофандрин, галоперидол, пентамидин, пимозид, рисперидон, тамоксифен, спарфлоксацин, терфенадин
Медленное S-метилирование 6-меркаптопуринов	При нарушении метаболизма возможно развитие тяжёлых токсических осложнений, в том числе сердечной недостаточности	Тиопурин S-метилтрансфераза	1 из 300 чел. в мире имеет чрезвычайно низкую активность фермента или активность фермента отсутствует; 50% — корейцы, японцы, 17% — негры, 14% — кавказцы	Азатиоприн
Медленный или быстрый метаболизм пиримидинов	При снижении скорости метаболизма — развитие токсических осложнений, при повышении — резистентность к терапии	Дигидропиримидиндегидрогеназа	3% людей в мире имеют сниженную активность фермента, <1 из 1000 чел. в мире имеет повышенную активность фермента	5-флуорацил

Наиболее часто в клинической практике встречаются индивидуальные особенности всасывания и выведения ЛВ. Они определяются не только на генетическом уровне, но и зависят от наличия заболеваний желудочно-кишечного тракта, почек и печени. Генетические особенности наиболее часто связаны с нарушением процессов окисления, S-метилирования и ацилирования, что приводит к замедлению выведения ЛВ из организма и повышению вероятности возникновения токсических осложнений при применении соответствующих ЛВ.

Так, было доказано наличие индивидуальных генетических особенностей метаболизма, протекающего с участием цитохрома Р-450: показано, что у 5–10 % кавказцев скорость метаболизма препарата снижена. Обнаружено, что такая особенность метаболизма связана с рецессивной мутацией, приводящей к снижению активности дебризохинолин-гидгоксилазы (CYP2D6). Частоты встречаемости низкой скорости метаболизма ЛВ этим ферментом в разных популяциях приведены на рис. 2.22.

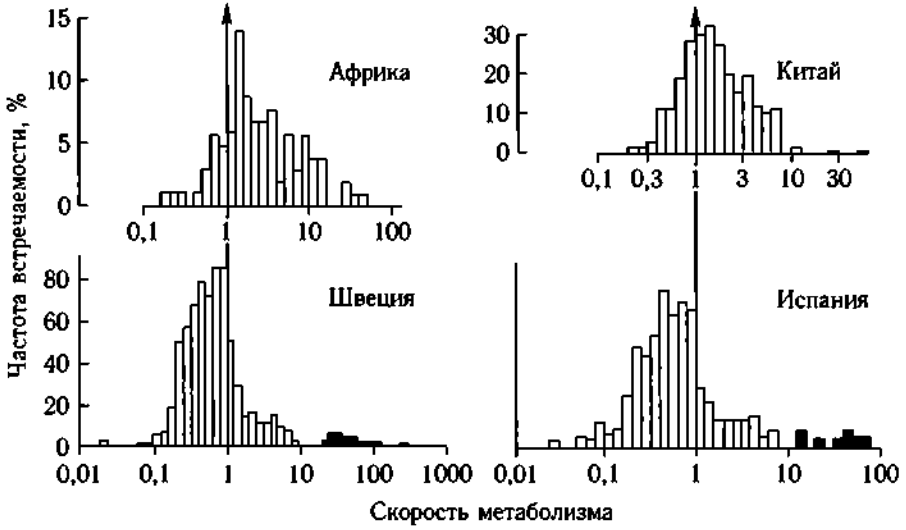


Рис. 2.22. Частоты встречаемости разных изоформ CYP2D6. Закрашенная область соответствует чрезвычайно низким скоростям метаболизма ЛВ этим ферментом (мутантный фермент)

Множество ЛВ метаболизируется с участием этого фермента, кроме того, ряд ЛВ может повлиять на этот метаболизм (см. рис. 2.20). Аналогичные данные для другого фермента, относящегося к суперсемейству цитохрома Р-450, CYP3A4, приведены в табл. 2.11. При низкой скорости метаболизма ЛВ основным ферментом может наблюдаться его перекрёстная (альтернативная) утилизация другим ферментом (см. рис. 2.21), что в ряде случаев приводит к появлению токсических соединений.

В результате изменения скорости и/или направления метаболизма наблюдается изменение клиренса ЛВ, повышается его концентрация в плазме крови, увеличивается время полувыведения, возрастает риск развития токсических осложнений при лекарственной терапии. Если больному одновременно назначается несколько ЛВ, метаболизирующихся с участием цитохрома Р-450, то вероятность развития токсических осложнений лекарственной терапии возрастает в несколько раз.

Другим ферментом, активность метаболизма ЛВ которым определяется на генетическом уровне, является N-ацетилтрансфераза. Обнаружено, что через 6 ч после введения противотуберкулёзного препарата изониазида *per os*, распределение его концентраций в плазме крови является полимодальным, а если взять кровь через 2 ч

Таблица 2.11

Частота встречаемости различных изоформ цитохрома Р-450

Ферменты	Основные аллели	Мутации	Изменение функции	Частота встречаемости аллели, %			
				Кавказцы	Азиаты	Негры	Эфиопы
CYP2A6	CYP2A6/2	Leu160 на His	Неактивный фермент	1–3	0	н. о.	н. о.
	CYP2A6del	Делеция гена	Фермент не вырабатывается	1	15	н. о.	н. о.
CYP2C9	CYP2C9/2	Arg144 на Cys	Снижение сродства к Р-450 оксидоредуктазе	8–13	0	н. о.	н. о.
	CYP2C9/3	Il359 на Leu	Нарушение субстратной специфичности	6–9	2–3	н. о.	н. о.
CYPC19	CYPC19/2	Хромосомная абберация	Неактивный фермент	13	23–32	13	14–15
	CYPC19/3	Дополнительный стоп-кодон	Неактивный фермент	0	6–10	н. о.	0–2
CYP2D6	CYP2D6/2 × N	Дупликация или мультидупликация гена	Снижение активности фермента	1–5	0–2	2	10–16
	CYP2D6/4	Нарушение спайсинга	Неактивный фермент	12–21	1	2	1–4
	CYP2D6/5	Делеция гена	Фермент не вырабатывается	2–7	6	4	1–3
	CYP2D6/10	Pro34 на Ser, Ser486 на Thr	Нестабильный фермент	1–2	51	6	3–9
	CYP2D6/17	Thr107 на Ile, Arg296 на Cys, Ser486 на Thr	Снижение сродства к субстратам	0	н. о.	34	3–9

н. о. — Не определяется.

после перорального введения препарата, то распределение его концентраций будет мономодальным. Следовательно, имеются индивидуальные особенности метаболизма, а не всасывания изониацида. Оказалось, что особенности метаболизма данного ЛВ связаны с N-ацетилтрасферазой-2 (NAT2). При этом как у кавказцев, так и у негров встречаются лица как с более быстрым, так и с более медленным метаболизмом изониазида. Быстрый и медленный метаболизм наследуется аутосомно рецессивно, частота встречаемости гена, кодирующего NAT2 с высокой активностью составляет примерно 5,5%, с низкой — 76,7%.

После внедрения в широкую практику гидразида изоникотиновой кислоты было показано, что переносимость препарата разная: у ряда больных наблюдалось развитие токсических эффектов (головная боль, головокружение, тошнота, рвота, боли за грудиной, раздражительность, бессонница, тахикардия, полиневрит и др.). Обнаружено, что основной путь метаболизма препарата — расщепление N-ацетилтрансферазой печени, при этом у одних больных скорость выведения этого ЛВ в 2–3 раза ниже, чем у других. Доказано, что скорость метаболизма не влияет на эффективность терапии туберкулёза, но резко повышает вероятность развития токсических эффектов при терапии.

Псевдохолинэстераза, гидролизующая эфиры холина и ароматических и алифатических аминокислот, синтезируется в печени. Фермент метаболизирует деполяризующий миорелаксант сукцинилхолин. У большинства людей он вызывает кратковременное (2–3 мин) расслабление поперечно-полосатых мышц, что связано с быстрым гидролиза сукцинилхолина. У лиц с мутантной формой фермента время выведения сукницила может составлять 2–3 ч и более, что приводит к параличу дыхания.

При недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы приём ряда ЛВ может вызывать гемолиз эритроцитов, что связано со снижением содержания в них восстановленного глутатиона и дестабилизации мембран. Следует иметь в виду, что гемолиз могут вызывать не только ЛВ, но и конские бобы, красная смородина и крыжовник. У ряда больных гемолиз развивается только при наличии предрасполагающих факторов: недостаточность печени или почек, метаболический ацидоз и др.

Каталаза является ферментом, осуществляющим расщепление перекисей и гидроперекисей. Акаталазия — редкое аутосомное рецессивное заболевание, определяемое несколькими генами, при нём полностью отсутствует каталаза во всех тканях. Впервые на это заболевание обратили внимание японские врачи, которые обнаружили, что у девочки, прооперированной по поводу гангренозной гранулёмы, обработка перекисью водорода не вызывала образования пузырьков, а цвет крови становился коричнево-жёлтым.

Выяснилось, что существует несколько генов, кодирующих K^+-каналы сердца, причём эти гены локализованы на разных хромосомах. Несколько аутосомных рецесивных мутаций определяют варианты K^+-каналов, часть из которых характеризуется замедленным возбуждением. У лиц с такими каналами может отмечаться синдром удлинения интервала QT. Однако более часто у лиц с мутантными генами, кодирующими K^+-каналы в интактном состоянии, длительность интервала QT не отличается от нормативных величин, при этом ряд ЛВ (см. табл. 2.10) могут резко увеличивать его.

Относительно недавно обнаружено, что фармакогенетические особенности могут определять не только токсические эффекты противораковой терапии, но и резистентность к ней. Первым ключевым ферментом, с изменением активности которого могут быть связаны токсические эффекты применения цитостатических препаратов, является тиопурин-S-метилтрасфераза. Он катализирует S-метилирование 6-меркаптопуринов с образованием неактивных продуктов. У лиц с низкой активностью фермента развиваются тяжёлые апластические анемии, что связано с подавлением гемо-

поэза. Другой фермент — дигидропиримидин-дегидрогеназа катализирует начальное превращение пиримидинов (тимидина, урацила, 5-флуорацила и др.) в соединения, необладающие биологической активностью. 5-Флуорацил широко используется для лечения рака молочных желёз и некоторых других видов опухолей. При сниженной скорости метаболизма отмечается развитие токсических эффектов терапии, при повышенной — резистентность к ней.

Как следует из приведённых данных, индивидуальные особенности активности ферментных систем могут иметь существенное значение для появления побочных эффектов лекарственной терапии. Возникает естественный вопрос: в какой мере можно предвидеть индивидуальные особенности метаболизма ЛВ до назначения соответствующей терапии? До начала 1990-х гг. ответ на этот вопрос был статистическим: были определены вероятности встречаемости мутантных вариантов генов ферментов в различных популяциях, в соответствии с ними определяли вероятность развития осложнения при назначении лекарственной терапии исходя из данных о наследственности. Также предполагалось использовать провокационные тесты: назначать больному небольшую дозу ЛВ и при этом определять скорость его элиминации. Однако такие исследования оказались достаточно дорогими, кроме того, они не учитывали кумулятивных эффектов ЛВ.

В настоящее время интенсивно разрабатываются методы ДНК-диагностики мутантных форм ферментов. В частности, в США с 1990 г. широко используется диагностика аллельных форм CYP2D6. Наибольшее распространение получило определение полиморфизма отдельных нуклеотидов (SNP — *single nucleotide polymorphisms*). Эта методика позволяет не проводить трудоёмкую процедуру полного анализа ДНК, а выявлять лишь те участки, в которых могут быть мутации, определяющие активность соответствующих ферментов. Однако для её успешного применения предварительно необходимы популяционные исследования, которые позволили бы выявить все мутации и их значение с точки зрения фармакогенетики.

Индивидуальные особенности фармакокинетики лекарственных средств следует учитывать при планировании фармакокинетических исследований: индивидуумы, выбранные для исследований, не должны иметь мутантных генов метаболизма ЛВ или же должна быть обследована достаточно большая популяция с тем, чтобы выявить носителей мутантных генов. В противном случае могут быть сделаны ошибочные заключения о скорости метаболизма ЛВ, что повлечёт за собой ошибочные рекомендации по стандартным режимам их дозирования.

В экспериментах на животных генетические особенности биотрансформации могут привести к ошибочным выводам относительно эффективности ЛВ. Так, общеизвестно, что у грызунов метаболизм нестероидных противовоспалительных препаратов протекает существенно быстрее, чем у человека. Поэтому фармакологический эффект у них достигается при введении более высоких доз. Если бы исторически не сложилось так, что аспирин был изначально протестирован на человеке, то мы до сих пор могли бы не знать такого препарата.

Кроме того, у животных существуют межлинейные отличия, которые обусловливают особенности эффектов ЛВ. Поэтому надо тщательно подбирать не только вид, но и линию животных, а также модель, в которой изучается данный эффект. Так, по нашим данным, анксиолитический эффект синтетического аналога лигандов опиоидных рецепторов даларгина обнаруживается только у крыс линии Wistar в условиях предварительной водной депривации (лишение доступа к воде) при периферическом введении препарата. Назначение даларгина крысам August, Wag и др. не позволяло получать подобный эффект. Также он не наблюдался при центральном введении, без водной депривации. Кроме того, данный эффект наблюдался в узком диапазоне доз.

2.6. Выведение лекарственных веществ с калом, мочой, слюной и другими биологическими жидкостями

В эксперименте на животных бывает удобней определять концентрацию ЛВ не в крови, а в выделениях из организма: в кале, слюне, моче и других биологических жидкостях. При этом удаётся неивазивно определить изменение концентрации ЛВ и его метаболитов в зависимости от времени. Для сбора биологического материала используют специальные устройства. Для сбора мочи применяют катетеры или воронки, которые крепят непосредственно у наружных мочевыделительных органов и соединяют с накопительным резервуаром. Для сбора кала необходимы клетки с сетчатым полом и поддоном (рис. 2.23). Необходимо, чтобы кал не смешивался с мочой.

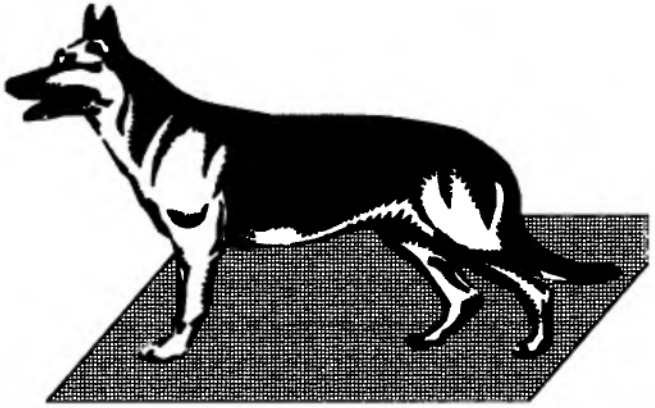


Рис. 2.23. Сетка на полу клетки для сбора кала у экспериментальных животных

Предположим, что в модели, приведённой на рис. 2.11, ЛВ поступает в изучаемое устройство (например, полностью выделяется с мочой). Тогда дифференциальное уравнение поступления ЛВ в мочу запишется следующим образом:

$$\frac{dm_2}{dt} = k_{эл} m, \tag{15}$$

где m_2 — масса ЛВ в изучаемой жидкости.

Можно показать, что для схемы, приведённой на рис. 2.11, изменение массы ЛВ в изучаемой биологической жидкости описывается следующим уравнением:

$$m_2 = \frac{M k_1 k_{эл}}{k_1 k_{эл}(k_{эл} - k_1)} \left(k_{эл} - k_1 + k_1 e^{-k_{эл} t} - k_{эл} e^{-k_1 t}\right). \tag{16}$$

Уравнение (16) отличается от уравнения (8) коэффициентами, стоящими перед экспонентами, а не показателями экспонент. Кроме того, как следует из уравнения (16), изменение концентрации ЛВ в кале, моче, слюне и т. д. описывается запаздывающей функцией (по сравнению с кровью).

В качестве иллюстрации запаздывающей функции мы приводим данные работы [21], в которой изучалось изменение концентрации эноксацина в плазме крови и биологических жидкостях после капельного внутривенного введения 428 мг препарата (за 1 ч) 11 здоровым донорам (табл. 2.12). Как следует из данных рис. 2.24, кинетика повышения и уменьшения концентрации эноксацина в плазме крови и слюне характеризуется экспонентами с одинаковыми показателями (так как тангенс угла наклона одинаков).

Таблица 2.12

Изменение концентрации эноксацина в плазме крови и слюне после внутривенной инфузии 428 мг препарата за 1 ч

Время после начала инфузии, ч	Концентрации в плазме крови, мкг/мл	Концентрация в слюне, мкг/мл
0,5	2,2	0,93
1	3,37	1,8
1,25	4,4	2,39
1,5	5	3,24
1,75	3,39	3,5
2	1,9	3,14
2,25	1,49	2,3
2,5	1,23	1,7
3	1,08	1,17
4	0,95	0,74
4,82	0,87	0,6
7	0,7	0,46
9	0,6	0,38
11	0,5	0,32

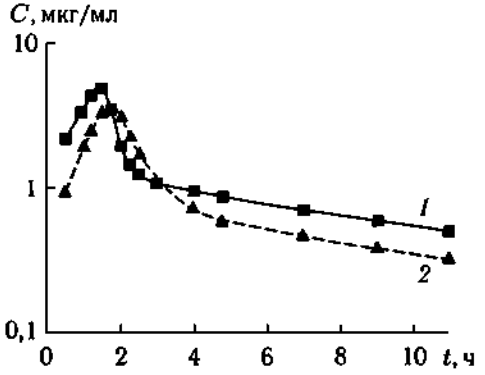


Рис. 2.24. Изменение концентрации эноксацина в плазме крови (1) и слюне (2) после начала внутривенной инфузии препарата [21]

2.7. Изменение фармакокинетики при ионизации лекарственного вещества

До сих пор при рассмотрении фармакокинетических моделей мы предполагали, что ЛВ находится только в одной форме. Однако реально может наблюдаться обратимое перераспределение между различными формами ЛВ. Такое перераспределение также может быть связано с обратимой диссоциацией ЛВ, так как многие ЛВ

являются слабыми основаниями и щелочами:

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-,$$

где HA — недиссоциированная молекула ЛВ; H^+ — основание; A^+ — кислота.

В данном случае терапевтическим действием может обладать только одна (протеонизированная или депротеонизированная) форма ЛВ, а элиминации подвергаться другая форма ЛВ (табл. 2.13, 2.14). В этом случае для описания фармакокинетической модели удобно использовать уравнение Хендерсона–Хассельбаха:

$$\ln y = \text{pH} - \text{p}K, \qquad (17)$$

где y — доля диссоциированных молекул; pK — логарифм равновесной константы диссоциации.

Таблица 2.13

Лекарственные вещества, для которых скорость элиминации почками зависит от pH крови [8]

Слабые кислоты	pK	Слабые основания	pK
Амобарбитал	7,9	d-Псевдоэфедрин	9,3
Аспирин	3,5	Амфетамин	9,8
Бензилпенициллин	2,8	Атенолол	9,6
Индометацин	4,5	Ацебутолол	9,4
Карбензициллин	2,6	Мексилетин	9,0
Салицилаты	3,5	Трициклические антидепрессанты	8–9,7
Сульфаты	4,9–7,4	Фенциклидин	9,4
Фенобарбитал	7,2	Хинин	8,4
Фуросемид	3,9	Эфедрин	9,4

Таблица 2.14

Константы ионизации некоторых препаратов [7]

Слабые кислоты	pK	Слабые основания	pK	Слабые основания	pK
Ампициллин	2,5	Аминазин	9,3	Пиндолол	8,8
Аспирин	3,5	Бунивакаин	8,1	Пириметамин	7
Ацетазоламид	7,2	Гидралазин	7,1	Проканн	9
Варфарин	5	Гуанетидин	11,4	Прокаинамид	9,2
Геофиллин	8,8	Дезипрамин	10,2	Промазин	9,4
Ибупрофен	4,4	Дигидрокодеин	8,8	Прометазин	9,1
Кромолин натрия	2	Дидрокодеин	9	Псевдоэфедрин	9,8
Леводопа	2,3	Дифенгидрамин	9	Скополамин	8,1
Метилдопа	2,2	Дифеноксилат	7,1	Стрихнин	8
Метотрексат	4,8	Изопротеренол	8,6	Тербуталин	10,1
Пенициллами́н	1,8	Имипрамин	9,5	Тиоридазин	9,5

Таблица 2.14 (*окончание*)

Слабые кислоты	pK	Слабые основания	pK	Слабые основания	pK
Пентобарбитал	8,1	Канамицин	7,2	Фенилефрин	9,8
Пропилтиоурацил	8,3	Клонидин	8,3	Физостигмин	7,9
Салициловая кислота	3	Кодеин	8,2	Флюфеназин	8
Сульфадиазин	6,5	Кокаин	8,5	Хинидин	8,5
Сульфапиридин	8,4	Лидокаин	7,9	Хлордиазепоксид	4,6
Толбутамид	5,3	Метадон	8,4	Хлорохин	10,8
Фенитоин	8,3	Метамфетамин	10	Хлорфенирамин	9,2
Фенобарбитал	7,4	Метараминол	8,6	Циклизин	8,2
Фуросемид	3,9	Метилдофа	10,6		
Хлоротиазид	6,8	Метисергид	6,6		
Хлоропропамид	5	Метопролол	9,8		
Этакриновая кислота	3,5	Морфин	7,9		
Основания					
Адреналин	8,7	Альбутерол	9,3	Пилокарпин	6,9
Аллопуринол	9,4	Никотин	7,9	Эрготамин	6,3
Альпренолол	9,6	Норадреналин	8,6	Эфедрин	6,3
		Пентазоцин	9,7		

Степень ионизации ЛВ необходимо учитывать при нарушении кислотно-основного равновесия вне зависимости от причин, вызвавших это нарушение. Так, защелачивание (алкалоз) может приводить к существенному увеличению скорости элиминации кислых соединений и задержке щелочных. Напротив, ацидоз (закисление) ускоряет выведение щелочных ЛВ и вызывает задержку кислот.

2.8. Кинетика ответа эффекторных органов

До настоящего времени мы рассматривали кинетику изменения концентрации ЛВ в органах и тканях. Однако клеточный ответ (и в конечном итоге эффективность терапии) определяется взаимодействием ЛВ с эффекторными молекулами в органах-мишенях и тканях-мишенях. В качестве эффекторных молекул могут выступать рецепторы, ферменты, ДНК, РНК и др.

Существует два принципиальных типа ответа эффекторных систем (рис. 2.25) [4]:
— с плато на зависимости доза–эффект,

$$y = \frac{Ax}{B + x}, \tag{18}$$

— с максимумом на зависимости доза–эффект:

$$y = Ax \exp(-Bx), \tag{19}$$

где x — доза; y — эффект; A, B — коэффициенты пропорциональности.

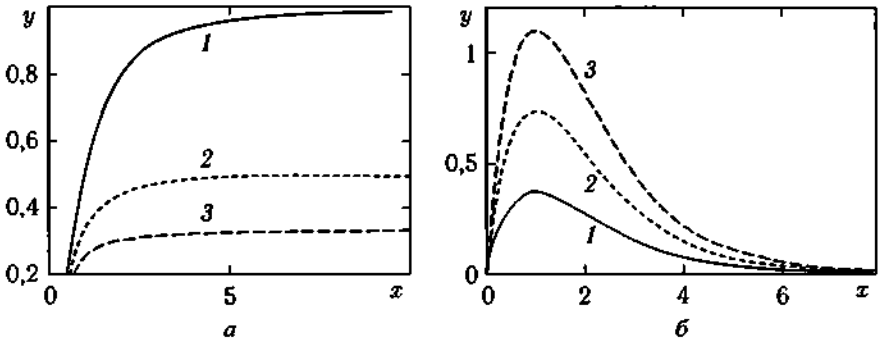


Рис. 2.25. Зависимости доза–эффект с плато (уравнение (18)) (*а*) и с максимумом (уравнение (19)) (*б*). Вариация параметра A, $B = 1$

Исходя из этих ответов, могут быть получены другие, более сложные зависимости доза–эффект (рис. 2.26) [11]. В конечном итоге может оказаться, что динамика



Рис. 2.26. Классификация зависимостей доза–эффект

развития эффекта на введение ЛВ определяется не дозой, а скоростью изменения дозы, площадью под фармакокинетической кривой и другими фармакокинетическими параметрами.

С учётом полученных данных в качестве иллюстрации рассмотрим кинетику развития анальгетического эффекта опиатов [6]. Предположим, что анальгетическая реакция на действие опиатных агонистов с концентрацией [L] в микроокружении рецептора развивается в соответствии со схемой:

$$\mathrm{L} + \mathrm{R} \overset{K_\text{д}}{\rightleftharpoons} \mathrm{LR} + \mathrm{E} \overset{K}{\rightleftharpoons} \mathrm{LRE} \xrightarrow{\gamma} \begin{matrix}\text{биологический} \\ \text{ответ,}\end{matrix} \qquad (20)$$

которая предполагает, что биологический ответ на действие соединений прямо пропорционален (с коэффициентом пропорциональности γ) концентрации комплекса лиганд–рецептор–эффектор (LRE), где E — эффектор, через который формируется анальгетический ответ, и гиперболическим образом зависит от [LR]:

$$A = \gamma \frac{[\mathrm{E}]_0[\mathrm{LR}]}{K + [\mathrm{LR}]}.$$

С учётом факта существования у опиоидных рецепторов феномена их «избыточности», можно показать, что

$$A = \gamma \frac{[\mathrm{E}]_0}{\dfrac{K}{[\mathrm{L}]}\dfrac{K_\text{д}}{[\mathrm{R}]_0} + 1}.$$

При рассмотрении кинетики анальгетического эффекта необходимо учитывать временную зависимость [L]. Было показано (рис. 2.27), что при мгновенном вводе

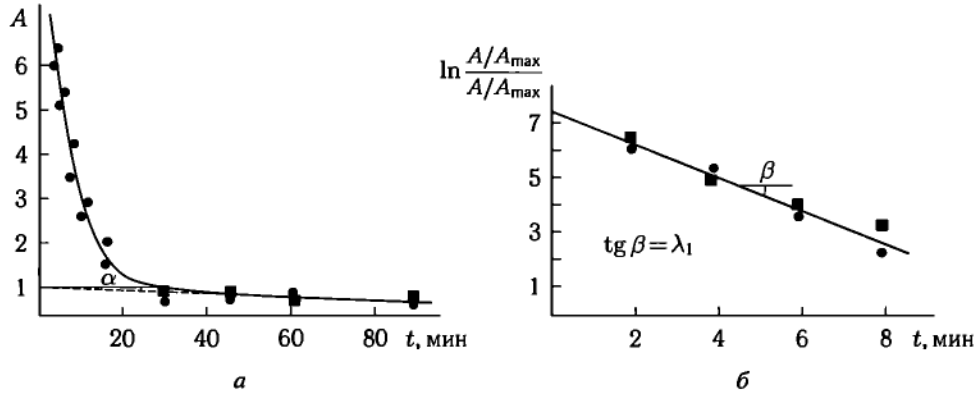


Рис. 2.27. Кинетическая кривая изменения опиатной активности в плазме собаки при внутривенном введении даларгина в дозе 50 мкг/кг (*а*), определение кинетических параметров (*б*)

соединения фармакокинетика морфина у животных описывается биэкспоненциальной зависимостью с характерным временем порядка минут и часа. Это позволяет предположить, что через 10 мин после введения морфина его фармакокинетика в организме будет определяться одной, медленной, экспонентой и, таким образом, зависимость фармакологического ответа на действие морфина может быть представлена в виде:

$$A = \frac{A_{max} \exp(\lambda_2 t)}{\beta + \exp(\lambda_2 t)}, \qquad A_{max} = \gamma[E]_0, \qquad \beta = \frac{K}{[L]} \frac{K_д}{[R]_0}.$$

Преобразуя полученное соотношение, имеем:

$$\ln \frac{A/A_{max}}{1 - A/A_{max}} = \lambda_2 t + \ln \beta \qquad (21)$$

и, следовательно, тангенс угла наклона зависимости $\ln \frac{A/A_{max}}{1 - A/A_{max}}$ от t соответствует λ_2, а отрезок на оси ординат — $\ln(1/\beta)$ (рис. 2.28).

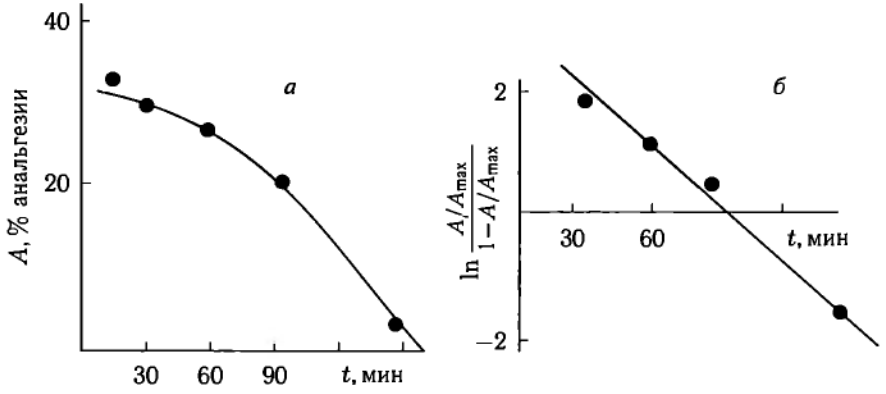


Рис. 2.28. Зависимость анальгетического эффекта морфина в тесте «горячей пластины» от времени (*а*). Определение кинетических параметров (*б*)

Таким образом, ответ эффекторных органов на ЛВ не всегда связан с концентрацией ЛВ в крови в текущий момент времени; он может сложным образом зависеть от динамики изменения концентрации ЛВ в крови. Это необходимо учитывать при выборе режимов введения ЛВ (см ниже), так как только в простейшем случае (например, для антибактериальных препаратов) верно предположение: чем больше концентрация ЛВ в крови, тем больше терапевтический эффект. Для многих ЛВ данное предположение неверно.

2.9. Транспортные системы лекарственных веществ и химические принципы их функционирования

Большинство ЛВ в плазме крови лишь частично находится в свободном виде, остальная часть ЛВ связана с белками-переносчиками. Только для ряда ЛВ существуют специфические белки-переносчики, большинство препаратов транспортируется альбуминами (табл. 2.15), эритроцитами, неспецифическими транспортными системами.

Транспорт ЛВ — чрезвычайно важный процесс. Связанный с белком-переносчиком препарат не может взаимодействовать с эффекторными системами (в частности, рецепторами), т. е. он выполняет роль депо, а не активного действующего начала. Кроме того, различные низкомолекулярные биологически активные вещества распространяются в организме, достигая мест своего действия и органов выделения с помощью кровотока. Циркуляция транспортируемого вещества в крови создаёт условия для его системного действия, причём длительность этого действия часто коррелирует с продолжительностью присутствия препарата в русле крови.

Транспортные функции сывороточного альбумина, о которых указывалось уже 160 лет назад (H. Ancell, 1839), а также других белков плазмы и форменных элементов крови всё ещё изучены недостаточно, но вследствие исключительного прикладного значения привлекают всё больше внимания. Данные о фармакокинетике ЛВ необходимы для разработки оптимальных схем дозирования ЛВ (пути введения, начальная, поддерживающая, курсовая дозы, интервал между дозами) и для поиска новых препаратов с желаемыми закономерностями распределения.

Анализ литературных данных показывает, что характер взаимодействия низкомолекулярных соединений с транспортными системами крови определяет их фармакологическую активность и селективное накопление в том или ином органе. Ключевая роль связывания белками плазмы лекарственных веществ при определении их фармакокинетики в организме представлена на рис. 2.29.

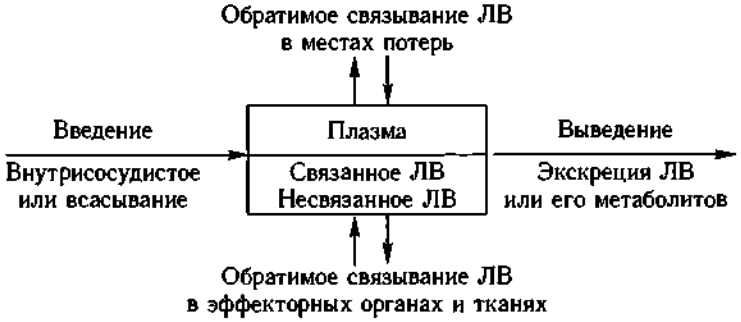


Рис. 2.29. Роль транспортных белков в фармакокинетике лекарственных веществ

Таблица 2.15

Степень связывания (СС) ряда лекарственных веществ с белками крови [25]

Препарат	СС, %	Препарат	СС, %
Амитриптилин	96,4	Оксациллин	94
Амоксициллин	18	Окситетрациклин	15
Ампициллин	20	Папаверин	87
Амфетамин	23	Парацетамол	0
Аскорбиновая кислота	24	Пириметамин	27
Ацетилсалициловая кислота	72	Прокаинамид	15
Бензилпенициллин	65	Пропанолол	93,2
Витамин Р	98	Рифампицин	85
Галоперидол	92	Стрептомицин	35,4
Гексобарбитал	70	Сульфадиметоксин	90
Гидралазин	87	Сульфазин	39
Гризеофульвин	80	Сульфаметоксазол	59
Диазепам	99	Сульфапридазин	80
Дигоксин	90	Сульфизоксазол	84
Дифенгидрамин	98,4	Тетрациклин	35,5
Доксициклин	30	Толбутамид	99
Изониазид	0	Теофиллин	50
Индометацин	90	Тиопентал	92,8
Клиндамицин	94	Триметоприм	69,6
Клонидин	55	Феназол	0
Кодеин	29	Фенилбутазон	98
Кофеин	17	Фенитоин	89,8
Ланатозид	25	Фенобарбитал	50,7
Лидокаин	66	Хинидин	75
Линкомицин	72	Хинин	70
Метробамат	0	Хлорпромазин	95,7
Метилдофа	0	Хлорпропамид	96
Метронидазол	8,2	Цефазолин	74
Морфин	24	Цефалексан	15
Нитразепам	87	Цефалотин	65
Нитрофурантоин	74,2	Эритромицин	73,4
Оксазепам	95,7	Этамбутол	24

2.9.1. Физико-химические аспекты комплексообразования низкомолекулярных веществ с биомакромолекулами. Обычно взаимодействие ЛВ (лиганда) с любым белком рассматривается как обратимая реакция, подчиняющаяся закону действия масс:

$$A + P \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} AP, \qquad (22)$$

где k_1 и k_2 — соответственно константы скорости ассоциации и диссоциации комплексов; А — ЛВ; Р — белок. Количественно сила взаимодействия или сродство лиганда к белку выражается с помощью равновесной константы ассоциации ($K_а$):

$$\frac{[PA]}{[A][P]} = \frac{k_1}{k_2} = K_а.$$

Часто пользуются обратной величиной $K_а$ — равновесной константой диссоциации $K_д$. Константа $K_д$ соответствует свободной концентрации лиганда, при которой 50% связывающих участков белка заполнено. Чем больше сродство лиганда к белку, тем больше будет $K_а$ и меньше $K_д$.

В большинстве случаев концентрация ЛВ существенно ниже, чем концентрация белков крови [1]. Так, в случае гормона роста концентрация связывающего белка составляет 1,5 мМ [28], а концентрация самого гормона — 0,5–2,0 нМ [16]. Данное соотношение означает, что для уравнения (22) концентрация комплексов ЛВ с белками крови равна (в предположении об отсутствии взаимодействия между несколькими связывающими участками белка)

$$r = n \frac{K_а[A]}{1 + K_а[A]},$$

где r — количество молей связанного лиганда на моль белка; n — общее количество связывающих участков.

Используя это уравнение в линейной форме

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{K_а}{n[A]}$$

или

$$r = n - \frac{r}{K_а[A]},$$

графически можно получить значения $K_а$ и n. Однако в случае наличия кооперативного взаимодействия между различными связывающими участками эти формулы дают лишь приближённые сведения о параметрах связывания.

В образовании комплекса белка с лигандом могут принимать участие те же 4 типа нековалентных взаимодействий, что и в формировании пространственной структуры белка в водном растворе: 1) водородная связь; 2) электростатическая связь; 3) Ван-дер-Ваальсова связь; 4) гидрофобные взаимодействия.

Как правило, в образовании того или иного комплекса молекул-партнёров принимают участие различные виды связей; однако считают, что специфичность комплексообразования обусловлена короткодействующими Ван-дер-Ваальсовыми силами.

Зная величину $K_а$, с помощью термодинамических уравнений можно рассчитать $\Delta G°$, а если известна зависимость $K_а$ от температуры, — энтальпию $\Delta H°$ и энтропию $\Delta S°$ связывания. Теоретически и экспериментально показано, что основной движущей силой электростатических и гидрофобных взаимодействий является изменение энтропии. Для определения параметров связывания лекарственных веществ с белками обычно пользуются классическими методами: равновесным диализом или ультрафильтрацией. Применение спектральных методов исследования (ЭПР, ЯМР,

спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия, спектрополяриметрия, спектрофлуориметрия и др.) позволяет получить дополнительную информацию о молекулярных механизмах взаимодействия и динамике комплексообразования.

Величина свободной фракции ЛВ зависит от его сродства к белку-переносчику и от концентраций взаимодействующих молекул. Эта зависимость для гипотетического ЛВ молекулярной массой 300 кДа приведена на рис. 2.30. Следовательно, зная

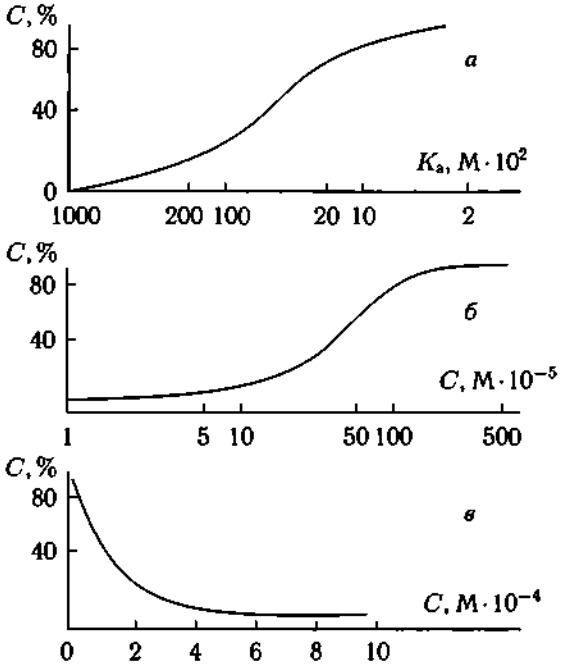


Рис. 2.30. Влияние на связывание альбумином ЛВ константы ассоциации (*а*), концентрации ЛВ (*б*), концентрации альбумина (*в*); *C* — концентрация несвязанного ЛВ

параметры связывания, объём распределения свободной фракции лекарства и общие концентрации лекарства и белка, всегда можно предсказать величину свободной, а значит, и биологически активной фракции данного ЛВ.

2.9.2. Специфические транспортные системы крови. В процессе эволюции были созданы как специфические, так и неспецифические транспортные системы крови. К первым можно отнести глобулины сыворотки, которые связывают и переносят многие эндогенные физиологически активные соединения. Тироксин, например, образует специфический комплекс с тироксинсвязывающим глобулином; кортизол, кортикостерон и прогестерон — с транскортином; тестостерон и эстрадиол — с секс-стероидсвязывающим глобулином; ионы железа — с трансферином, меди — с церулоплазмином; гем — с гемопексином; глобин — с гаптоглобином. Гистамин проявляет значительное сродство к глобулинам, на чём основано гистаминопектическое действие сыворотки. Липопротеины (среди которых выделяют хиломикроны, пре-β-липопротеин, α- и β-липопротеины) связывают триглицериды, фосфолипиды, холестерин и жирные кислоты.

Несомненный интерес представляет взаимодействие пептидных гормонов с составными компонентами крови. Существуют две фракции, связывающие инсулин, которые располагаются в области трансферинов и α-глобулинов. Связь инсулина

с трансферином оказалась более прочной (в образовании этого комплекса большую роль играет сиаловая кислота), связь с оразомукоидом — более слабая, так как она распадается при голодании и изменяется при нагрузке глюкозой. Предполагается, что эта последняя форма инсулина принимает участие в поддержании определённого уровня биологически активного инсулина, в то время как первая, связанная с трансферином, важна для доставки инсулина к жировой ткани.

Нарушение метаболизма глюкозы при уремии объясняется образованием прочного комплекса инсулина с одним из четырёх основных пептидов крови (молекулярная масса 1300). В норме этот пептид связан с сывороточным альбумином и не может ингибировать активность инсулина.

Среди других специфических транспортных систем крови необходимо упомянуть о тромбоцитах, которые имеют специфические рецепторы для серотонина. Содержание данного биогенного амина в тромбоцитах в 1000 раз превышает его концентрацию в плазме.

Таким образом, из приведённых данных следует, что связывание транспортными системами крови гормонов, витаминов и других эндогенных молекул влияет на их утилизацию в периферических тканях и создаёт их определённый резерв в русле крови. В то же время нужно подчеркнуть, что необходимы дальнейшие исследования природы связей этих эндогенных физиологически активных соединений со специфическими транспортными системами крови, чтобы более глубоко и полно раскрыть биологическую сущность данного явления.

2.9.3. Сывороточный альбумин — основной представитель неспецифических транспортных систем крови. Поскольку сывороточный альбумин обладает универсальной способностью связывать практически все экзогенные и эндогенные низкомолекулярные агенты, считается, что этот белок — основной представитель неспецифических транспортных систем крови. По-видимому, это обусловлено структурными особенностями альбумина, а именно чрезвычайной способностью изменять свою конформацию и бóльшим объёмом гидрофобных областей относительно объёма белковой глобулы по сравнению с другими белками.

В молекуле сывороточного альбумина человека 109 катионных и 120 анионных аминокислотных остатков; при pH 7,4 альбумин имеет отрицательный заряд. Тем не менее, сывороточный альбумин преимущественно связывает анионы, а не катионы. Данный феномен обусловлен следующими причинами: 1) катионные центры, в отличие от анионных, на поверхности альбумина окружены неполярными областями, что снижает эффективную диэлектрическую постоянную среды и усиливает электростатические взаимодействия; 2) OH-группы белковой цепи могут образовывать водородные связи с аминокислотными остатками, которые содержат группы COO^- и NH^+. Из данных об энергии водородной связи и рентгеноструктурных исследований треонина вытекает, что более выгодным является образование связи OH...–OOC. Поскольку в альбумине OH-групп недостаточно, чтобы образовывать водородные связи со всеми COO^-- и NH^+-группами, структура белка должна иметь небольшую жёсткость и NH^+-группы остаются в относительно открытом положении, доступном для связывания отрицательно заряженных лигандов.

Считается, что при связывании лекарств с альбумином электростатические силы относительно слабы, однако они важны для сближения молекул и соответствующей их ориентации. Комплекс будет тем прочнее, чем больше будет образовываться водородных и Ван-дер-Ваальсовых связей различных частей лиганда с аминокислотными остатками белка, которые образуют связывающий участок. Единственная SH-группа сывороточного альбумина является донором электронов и может образовывать с различными акцепторами комплексы с переносом заряда. Факт, что ацетилсалициловая

кислота по механизму трансацетилирования ковалентно связывается с ϵ-аминогруппой лизина-199, свидетельствует о возможности необратимого связывания альбумином некоторых лигандов.

В связи с тем, что связывание альбумином лигандов усиливается с увеличением липофильности последних, существование и важность гидрофобных взаимодействий не вызывают сомнения.

Неспецифический характер связывания лекарств альбумином не следует понимать так, будто комплексообразование не зависит от структуры лиганда. Очень часто такая зависимость имеется; иногда введение полярных групп даже усиливает сродство лиганда к альбумину, а для бензодиазепинов и триптофана взаимодействие с сывороточным альбумином стереоспецифично. Высокоспецифические комплексы характеризуются $K_a > 10^8\ M^{-1}$, и небольшие изменения в структуре лиганда приводят к уменьшению K_a на несколько порядков. Что касается сывороточного альбумина, то он связывает достаточно сильно жирные кислоты и билирубин ($K_a = 10^7$–$10^8\ M^{-1}$). Другие низкомолекулярные вещества, для которых определяли параметры связывания, взаимодействуют с альбумином с K_a около или ниже $10^6\ M^{-1}$.

Ниже перечислены ЛВ, которые при введении в организм в терапевтических дозах более чем на 80% связываются сывороткой, содержащей физиологическую концентрацию сывороточного альбумина (табл. 2.16).

Таблица 2.16

Связывание некоторых ЛВ с альбуминами [15]

ЛВ	Свободная фракция, %	ЛВ	Свободная фракция, %
Амитриптилин	4	Сульфинпиразон	5
Варфарин	3	Тиопентал натрия	13
Дезипрамин	8	Толбутамид	1
Диазепам	1	Фенилбутазон	1
Дигитоксин	10	Фенопрофен	1
Доксициклин	7	Фенитоин	9
Имипрамин	4	Фуросемид	3
Индометацин	3	Хинидин	11
Клоксациллин	5	Хлордиазепоксид	5
Клофибрат	10	Хлорпропамид	4
Сульфадимитоксин	10	Этакриновая кислота	10

Вещества, взаимодействующие с альбумином с K_a больше $10^4\ M^{-1}$, вызывают структурные изменения в молекуле белка, регистрируемые чувствительными методами. Так, стероиды обусловливают следующие эффекты: разрыхление белковой матрицы в районе локализации спиновых меток, при этом конформационные переходы осуществляются по аллостерическому механизму, подобно трансглобулярным переходам, наблюдавшимся при специфических воздействиях на ферменты; уменьшение микровязкости водно-белкового слоя в местах расположения иминоксильных радикалов и изменение микроокружения единственного триптофанового остатка альбумина. Методом флуоресцентных зондов обнаружено, что рентгеноконтрастные

вещества (билигност, трийотраст, эндографин) вызывают конформационные изменения сывороточного альбумина человека, которые характеризуются увеличением расстояний на 2–6 Å между каждыми двумя из трёх участков белка (триптофан, гистидин, SH-группа) и изменением микроструктуры водно-белкового слоя в районе локализации триптофанового остатка.

Конформационные перестройки альбумина выявлены также при связывании фенилбутазона, варфарина, флуфенаминовой кислоты, оксифенилбутазона, имипрамина, дезметилимипрамина, флуфеназина, иопаноата и иофеноксоата, сурамина, жирных кислот, бромсульфталеина пенициллинов, антиревматических препаратов, тироксина, наркотических анальгетиков. По всей вероятности, такие воздействия ЛВ на структуру альбумина имеют определённое значение в генезе аллергических заболеваний.

Обычно для низкомолекулярных веществ на поверхности альбумина существуют несколько или один сильносвязывающий участок ($K_a = 10^4$–10^6 M^{-1}) и множество слабосвязывающих участков ($K_a < 10^3$ M^{-1}). Для многих анионных лигандов сильносвязывающий участок расположен вблизи триптофанового остатка. Это справедливо для тестостерона, кортизола, клофибрата, производных гомопиримидазола, бромсульфталеина, билигноста, трийотраста, эндографина. Считают, что связывающий участок альбумина, содержащий триптофановый остаток, состоит из двух частей: гидрофобного «кармана» (или полости), образованного боковыми цепями неполярных аминокислотных остатков, и катионного центра, расположенного в этой полости или вблизи неё.

На основании изложенного можно сделать вывод, что каждая группа веществ имеет только ей свойственные особенности взаимодействия с альбумином. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия лекарств с альбумином важно не только для выяснения физико-химических факторов, которые определяют распределение и выведение лекарств из организма, но и для понимания механизмов взаимодействия лекарственных веществ с рецепторами. Поскольку сродство лекарств к альбумину часто коррелирует с их биологической активностью, комплекс альбумина с лекарством можно рассматривать как модель его взаимоотношений с рецептором.

2.9.4. Физиологическое значение связывания низкомолекулярных веществ с транспортными белками. Связывание ЛВ с белками в зависимости от механизма выделения лекарства может ускорить или замедлить скорость его экскреции. Если вещество выделяется только посредством фильтрации почками, то тогда связывание с белками будет увеличивать время нахождения лекарства в организме. Для веществ, которые активно секретируются почечными канальцами, но которые затем реабсорбируются, связывание с белками тоже будет замедлять скорость их выделения. Кроме того, взаимодействие с сывороточными белками должно уменьшать метаболизм ЛВ ферментативными системами печени, особенно когда константа Михаэлиса ферментов высока. Однако если ЛВ быстро метаболизируются ферментами печени или быстро и активно секретируются почками, их клиренс (отношение скорости выделения к концентрации несвязанного ЛВ) может приближаться к скорости кровотока через соответствующий орган.

Можно утверждать, что процессы экскреции веществ из организма тесно связаны с физико-химическими показателями, обусловливающими образование комплекса ЛВ — сывороточный альбумин. При определённых условиях связывание ЛВ с белками или клетками крови может увеличивать скорость выделения их из организма, т. е. по механизму экскреции лекарства можно судить, являются ли белки транспортными системами или «местом потерь». С увеличением времени полунахождения лекарства в организме уменьшается вероятность первого и увеличивается вероятность второго

явления. Часто, однако, вещества, которые прочно связываются с белками плазмы, также прочно связываются и с молекулами, расположенными в тканях. В таком случае время полунахождения лекарства может быть большим (несколько дней, недель или даже лет), несмотря на то что скорость их метаболизма или активной экскреции лимитируется главным образом скоростью кровотока. Поэтому нельзя быть всегда уверенным, что клиренс лекарства будет низкий, если время полунахождения его в организме велико.

В большинстве теорий физико-химических факторов, определяющих путь экскреции ЛВ из организма, в первую очередь рассматривается способность сывороточного альбумина связывать определённое ЛВ и тем самым в зависимости от количественных и качественных характеристик комплексообразования способствовать выделению вещества печенью или почками. Особенно актуальны эти вопросы для рентгеноконтрастных веществ, так как сродство их к альбумину не только пропорционально гепатотропности вещества, но и его токсичности. Введение атома хлора, брома или иода в фенолфталеиновый радикал усиливает тропность его к протеинам крови, и вещество избирательно выделяется с жёлчью. Те вещества, которые прочно связываются с белками, выделяются печенью, а те, которые слабо, — посредством почек.

Однако на основании того, что синий Эванса, несмотря на очень сильное связывание с сывороточным альбумином, выделяется в основном почками, а *пара*-аминогиппуровая кислота при образовании слабых связей с альбумином выделяется печенью. P. K. Knoefel (1971) критически рассматривает положение о связывании низкомолекулярных веществ с плазменными белками, согласно которому комплексообразование механически определяет билиарный путь экскреции. Причиной таких противоречий, вероятно, являются недостаточные знания о динамике комплексообразования, так как большую роль в экскреции веществ играет скорость диссоциации комплекса. Кроме того, не изучен вопрос о роли конформационных изменений сывороточного альбумина, происходящих при связывании его с лигандами, в определении органоспецифичности веществ.

Используя простую кинетику Михаэлиса–Ментен, можно рассчитать, как белковое связывание и время жизни комплекса влияют на активную экскрецию вещества (рис. 2.31). На рисунке кривые экскреции ограничены штриховыми линиями: горизонтальной, которая отражает предел возможности экскретируемой системы (равенство скорости активной канальцевой экскреции и максимальной скорости этой

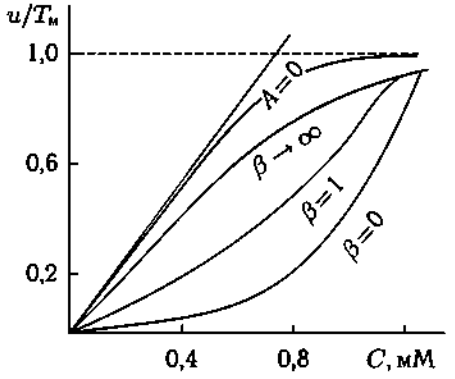


Рис. 2.31. Активная экскреция лекарств как функция концентрации их в плазме при различных скоростях диссоциации комплекса: по оси абсцисс — концентрация лекарства в плазме; по оси ординат — отношение скорости тубулярной секреции u к максимальной скорости $T_м$

экскреции $T_м$) и наклонной, которая указывает предел тока через систему ($u = VC$, где V — объём плазмы, протекающей через систему, а C — общая концентрация экскретируемого вещества в плазме). Если принять, что $K_д$ для комплексов альбумин–лиганд и внутриклеточный переносчик — лиганд одинаковы ($5 \cdot 10^{-5}$ М), то получаются три экскреторные кривые, отражающие три различные скорости диссоциации комплекса сывороточный альбумин — лиганд k_2 с учётом тока крови через систему t. На рис. 2.31 использовано отношение этих величин $\beta = -k_2/t$. Возможны следующие варианты: 1) диссоциация комплекса альбумин–лиганд не происходит, $\beta = 0$; 2) время жизни комплекса альбумин–лиганд намного превосходит время t, $\beta = 1$; 3) время жизни комплекса альбумин–лиганд равно t, $\beta \to \infty$.

Если альбумина нет, то получается кривая, которая приближается к ограничивающим штриховым линиям: $A = 0$.

Можно заключить, что независимо от времени жизни комплекса белковое связывание уменьшает количество активно секретируемого лиганда до тех пор, пока не достигается максимальная транспортная способность системы, и что в области равенства времени жизни комплекса и времени t система очень чувствительна к изменению β, т. е. соотношению t и k_2.

Альбумин с изменённым зарядом в противоположность нативному быстро исчезает из крови, поглощаясь лизосомами синусоидальных клеток печени. Можно предположить, что клетки печени каким-то образом «узнают» и активно захватывают комплексы альбумина, тем более что структура белка под воздействием низкомолекулярных агентов часто значительно изменяется.

Следует отметить, что в настоящее время нет общей теории, которая предсказывала бы свойства веществ, необходимые для их секретирования с желчью.

По-видимому, печень способна секретировать связанные с белками плазмы вещества более эффективно, чем почки (даже если вещества активно секретируются проксимальными канальцами). Одной из причин этого может быть большая длина синусоидов печени и более медленный ток крови через них. Эндотелиальная выстилка синусоидов печени образует межклеточные и трансэндотелиальные люки, обусловливающие самую высокую проницаемость микрососудов печени по сравнению со всеми другими органами. Белковое связывание имеет решающее значение для клубочковой фильтрации в почках; вероятно, и почечная секреция уменьшается для веществ с большим белковым связыванием.

С другой стороны, нет доказательств, что только связанное с белком вещество выделяется печенью. Можно полагать, что физико-химические свойства, повышающие белковосвязывающую способность ЛВ, увеличивают также печёночную секрецию.

Поскольку полярные вещества не могут проникать через липидный слой биомембран, логично предположить существование в секреторных клетках печени и почек специальных белков-переносчиков.

Такие транспортные системы ещё не идентифицированы, однако бромсульфталеин связывается с плазматическими мембранами печени *in vitro*, а вещества, которые конкурируют с данной краской при выделении печенью *in vivo*, ингибируют связывание бромсульфталеина с клеточной мембраной *in vitro*. В связи с этим интересно отметить, что эти же вещества, а именно иодипамид, индоциановый зелёный, флависпидовая кислота, находятся в конкурентных взаимоотношениях при связывании с сывороточным альбумином. Очевидно, альбумин имеет некоторое сходство с белками-переносчиками и может рассматриваться как модель таковых.

Говоря о внутриклеточном транспорте, придают большое значение Y- и Z-белкам. Данные белки обнаружены в цитоплазме клеток печени, почек, кишечника, миокарда, жировой ткани и поперечно-полосатых мышц. Y-белок, или, как его ещё называют, лигандин, имеет молекулярную массу 46000, константу седиментации 3,5.S и,

вероятно, состоит из двух субъединиц. Z-белок, в отличие от Y-белка, — кислый белок с молекулярной массой 12000. В то время как во вторичной структуре Y-белка в основном преобладает α-спираль, в Z-белке — β-форма. Эти белки связывают большое количество различных соединений: билирубин, жирные кислоты, тироксин, стероиды, канцерогены, пенициллин, бромсульфталеин, индоциановый зелёный, холецистографические вещества.

Дальнейшие исследования в этом направлении показали, что роль лигандина в процессах экскреции лекарственных веществ с жёлчью заключается в их связывании в печёночной клетке и в определении уровня их внутриклеточной аккумуляции.

Ещё один важный аспект, связанный с взаимодействием низкомолекулярных соединений с транспортными белками, — это регуляция последними физиологической активности лекарственных веществ. Связывание альбумином биологически активных веществ приводит к изменению их действия, при этом предотвращаются большие колебания между неэффективными и токсическими уровнями лекарств.

В результате многочисленных исследований H. Bennhold (1966) пришёл к выводу, что необходимо специально выделять существование «транспортных» болезней — заболеваний, при которых недостаточность одного или нескольких переносчиков играет решающую патогенетическую роль; другой причиной «транспортной» болезни может быть введение в кровоток некоторых экзогенных веществ, способных вступать в соперничество за занятие зоны связывания на альбумине.

На важность связывания ЛВ с альбумином указывает уже то, что побочные реакции при введении преднизолона, фенитоина и диазепама чаще встречаются у пациентов с гипоальбуминемией.

Особое значение имеют возможные конкурентные взаимоотношения низкомолекулярных веществ при их связывании с белками. Вещества, сходные по своему химическому строению, обычно имеют идентичные участки связывания, и присоединение одного из них по механизму конкурентного ингибирования уменьшает связывание другого. Если вещества связываются в разных участках макромолекулы, то одно вещество аллостерически может увеличить или уменьшить взаимодействие другого.

Вытеснение связанного с альбумином ЛВ может привести к нежелательным эффектам, так как активная несвязанная фракция ЛВ может удвоиться или утроиться. Так, описано наступление тяжёлых геморрагических явлений у больных, которых лечили антикоагулянтом варфарином, при введении фенилбутазона или оксифенилбутазона, вытесняющих варфарин и таким образом сильно повышающих его антикоагулянтное действие. К подобным эффектам вытеснения варфарина и других взаимодействующих с альбумином антикоагулянтов могут привести клофибрат, этакриновая кислота, трихлоруксусная кислота (метаболит хлоралгидрата), мефенаминовая и налидиксовая кислоты. Вытеснение толбутамида фенилбутазоном, сульфеназином, салицилином может вызвать гипогликемию.

В потенцировании действия одного ЛВ другим играют роль, по-видимому, не только отмечаемые эффекты, но и уменьшение метаболизма веществ в микросомах печени; возможно, существует интерференция и в процессах экскреции. Изменения в распределении и выделении одного ЛВ при его вытеснении другим представлены на рис. 2.32. В результате вытеснения концентрация вещества в интерстициальной жидкости и внутри клеток возрастает, клубочковая фильтрация увеличивается, а метаболизм и активная секреция вытесняемого ЛВ уменьшаются [18].

Изучение взаимодействия транспортных белков с лекарствами *in vitro* даёт ценную информацию о количественных и качественных характеристиках связывания. Но при перенесении в клинику результатов, полученных в эксперименте, необходимо всегда помнить, что объёмы распределения связанных и несвязанных фракций лекарства могут быть различны. Кроме того, поскольку исследования часто проводятся

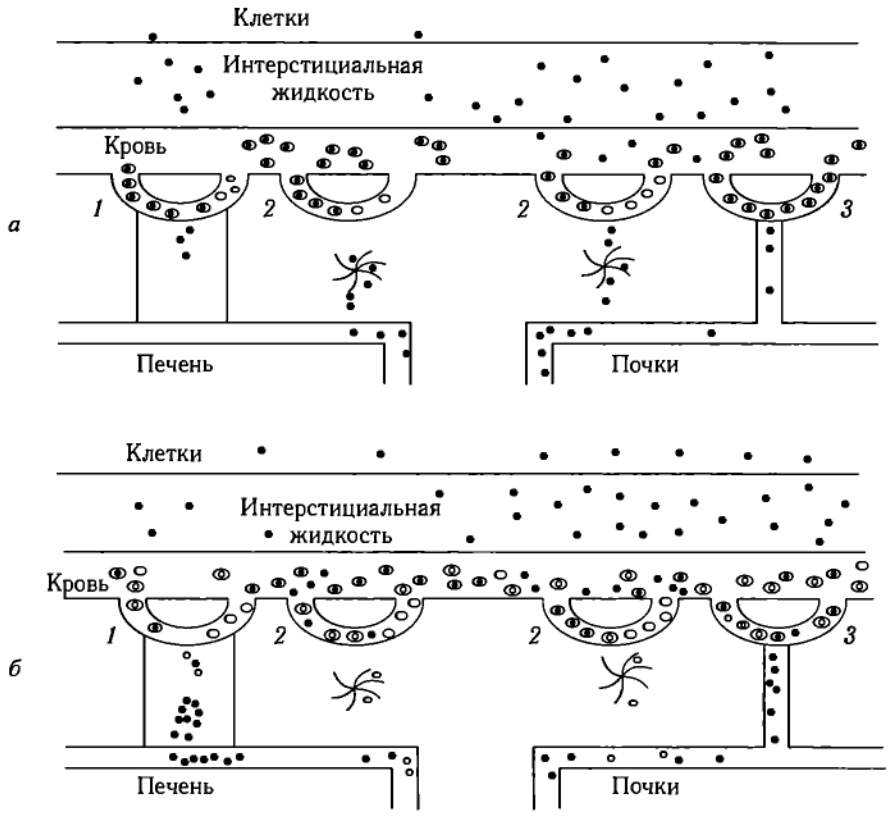


Рис. 2.32. Схема экскреции одного ЛВ в печени и почках до (*а*) и после (*б*) его вытеснения из связи с белками плазмы другим ЛВ: • — вытесняемое ЛВ; О — вытесняющее ЛВ; *1* — метаболизирующая клетка; *2* — секретирующая клетка; *3* — клубочек

с использованием сывороточного альбумина, полученного от разных видов животных, нужно помнить, что этот белок из сыворотки животных отличается по своей связывающей способности от человеческого. Нельзя не учитывать гетерогенности препаратов альбумина, которая может быть обусловлена «функциональным старением» и генетическими особенностями. Причём связывающая способность альбумина может меняться при некоторых заболеваниях [22].

Естественно, что при вытеснении низкомолекулярных веществ или при насыщении ими связывающей способности альбумина они могут взаимодействовать с другими компонентами крови. Однако детального анализа в этом отношении не проводилось. Для некоторых соединений билирубина, дифенилгидантоина показано, что при заполнении связывающих участков альбумина эти агенты взаимодействуют с эритроцитами.

Эритроциты, так же как и сывороточный альбумин, обладают огромной связывающей ёмкостью для липофильных низкомолекулярных соединений, поэтому и связывание ЛВ эритроцитами также должно сильно влиять на их фармакокинетику и фармакодинамику.

В заключение отметим, что если эндогенные физиологически активные вещества могут вступать во взаимодействие как со специфическими, так и неспецифическими

транспортными системами, то экзогенные ЛВ связываются в основном неспецифическими транспортными системами.

Для получения полной информации о характере транспорта низкомолекулярных соединений системой крови необходимо исследовать их взаимодействие со всеми составными её компонентами, но в первую очередь следует обращать внимание на их связывание с альбуминами и эритроцитами как основными неспецифическими транспортными системами крови.

2.9.5. Изменение биологического ответа на лекарственные вещества за счёт белков-переносчиков. Большинство ЛВ в плазме крови лишь частично находятся в свободном виде, остальная часть ЛВ связана с белками-переносчиками. Только для ряда ЛВ существуют специфические белки-переносчики, остальные препараты транспортируются альбуминами (табл. 2.15, 2.16), эритроцитами, неспецифическими транспортными системами.

Транспорт ЛВ — чрезвычайно важный процесс. Связанный с белком-переносчиком препарат не может взаимодействовать с эффекторными системами (в частности, рецепторами), т. е. он выполняет роль депо, а не активного действующего начала.

Большинство биологически активных веществ в крови находится не в свободном, а связанном с белками-переносчиками виде. Образование комплекса с белком-переносчиком описывает схема

$$\mathrm{H} + \mathrm{P} \overset{K}{\longleftrightarrow} \mathrm{HP}, \tag{23}$$

где H — ЛВ; P — белок-переносчик; HP — их комплекс; K — константа диссоциации.

В большинстве случаев концентрация ЛВ существенно ниже, чем концентрация белков крови [1]. В случае гормона роста концентрация связывающего белка составляет 1,5 мМ [28], а концентрация самого гормона — 0,5–2,0 нМ [16]. Данное предположение означает, что для схемы (23) концентрация комплексов ЛВ с белками крови [3] равна

$$[\mathrm{HP}] = \frac{[\mathrm{H}]_0[\mathrm{P}]}{[\mathrm{H}]_0 + K}, \tag{24}$$

где $[\mathrm{H}]_0$ — начальная концентрация ЛВ.

Для большинства ЛВ $K \gg [\mathrm{H}]$. Тогда уравнение (24) запишется так:

$$[\mathrm{HP}] = \alpha[\mathrm{H}]_0,$$

где α — константа, $\alpha = [\mathrm{P}]/K$.

Тогда концентрация свободного ЛВ равна

$$[\mathrm{H}] = [\mathrm{H}]_0 - [\mathrm{HP}] \approx [\mathrm{H}]_0(1-\alpha) = \beta[\mathrm{H}]_0, \quad [\mathrm{H}] \approx \beta[\mathrm{H}]_0, \tag{25}$$

где β — константа (степень связывания).

Если $\beta = 1$, то ЛВ не связывается с белками-переносчиками, если $\beta = 0$, то все молекулы ЛВ связаны белками крови.

Может быть так, что только связанная форма ЛВ или только несвязанная форма ЛВ (например, половые гормоны) выводится из крови. Это означает, что для линейной фармакокинетчиеской модели со всасыванием система уравнений (7) трансформируется следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{dt} &= -k_1 m_1, \quad m_1(0) = M, \\ \frac{dm_2}{dt} &= k_1 m_1 - \gamma k_{\text{эл}} m_2, \quad m_2(0) = 0, \end{aligned} \tag{26}$$

где γ — константа; $\gamma = \alpha$, если выводится только связанная форма биологически активного вещества, $\gamma = \beta$ в противном случае.

Решение системы уравнений (26) запишется так:

$$C(t) = C_0 [\exp(-k_{эл}\gamma t) - \exp(-k_1 t)]. \quad (27)$$

При анализе уравнения (27) следует иметь в виду, что при длительном введении ЛВ могут изменяться свойства белков-переносчиков, что в свою очередь приводит к модификации таких параметров, как β и γ. Особенно характерно изменение свойств белков-переносчиков для эстрогенов и ряда других гормональных препаратов.

В качестве иллюстрации изменений параметров β и γ приведём результаты работы [4]. В ней рассматривалась динамика развития клеточного ответа на гормон роста, описываемого уравнениями (18) и (19). При этом концентрация гормона изменялась в соответствии с уравнением (27). Как следует из рис. 2.33, изменение параметров β

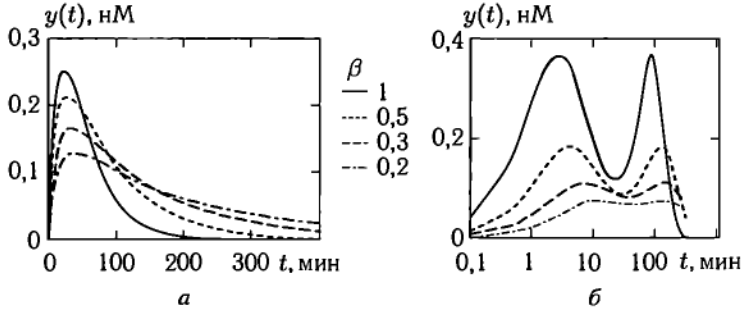


Рис. 2.33. Динамика развития клеточного ответа на гормон роста [4]. Изменение концентрации гормона описывается уравнением (27), а клеточный ответ: *а* — (18), *б* — (19); $k_{эл} = 0{,}0714$ мин$^{-1}$, $k_1 = 0{,}0277$ мин$^{-1}$, $C_0 = 1$ нМ, $\gamma = \beta$, $A = 1$

и γ может приводить к изменению не только величины, но и формы клеточного ответа. В случае, если клеточный ответ описывается уравнением (19), уменьшение β означает уменьшение расстояния между пиками.

2.9.6. Перфузионные фармакокинетические модели. Рассмотренные выше, так называемые классические, фармакокинетические модели отличались между собой степенью сложности, но имели одну общую черту: выбор фармакокинетической модели определялся апостериорно, после анализа изменения концентрации ЛВ в ткани или крови. При этом камеры и константы скоростей могли не иметь определённого анатомо-физиологического содержания.

Иные предположения закладываются при построении так называемых перфузионных (физиологических) моделей [23]. При их построении учитываются скорость и объём кровотока в каждой из тканей, а также распределение ЛВ в системе кровь–ткань. Данный подход позволяет оценить распределение лекарственного препарата в органах и тканях до его введения в организм. Если экспериментальные данные фармакокинетики не соответствуют модельным, то возможно уточнение модели за счёт введения дополнительных камер. Однако при этом следует иметь в виду, что для большинства ЛВ фармакокинетика с точностью до 5% (что соответствует ошибкам определения концентрации ЛВ) может быть описана без использования перфузионных моделей, т. е. ранее рассмотренными методами. Поэтому, с нашей точки зрения, применение перфузионных моделей оправдано только в том случае, если экспериментальные данные описываются камерными (как линейными, так и нелинейными) моделями с большой ошибкой. Во всех остальных случаях построение перфузионных моделей представляет собой больше теретический интерес. Это связано с тем, что при построении перфузионных моделей используется большое количество констант,

многие из которых не могут быть определены прямыми методами, т. е. погрешность их измерения существенно превышает 5%. Поэтому даже в тех случаях, когда перфузионная модель более точно описывает физиологические аспекты изменения концентрации ЛВ в тканях и средах организма, из-за неточности определения констант расчёт конечной концентрации ЛВ будет содержать существенные ошибки.

Как правило, перфузионные модели относятся к нелинейным фармакокинетическим моделям. Лишь изредка такие модели могут быть линейны. На рис. 2.34 приведена схема линейной перфузионной модели по [17].

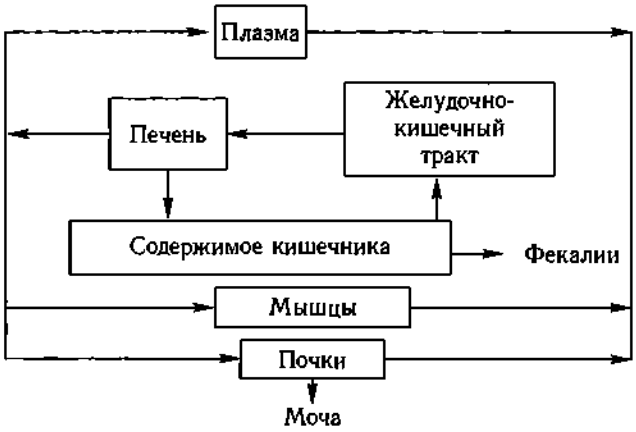


Рис. 2.34. Схема перфузионной модели

Перфузионные модели содержат обычно большое число уравнений. Поэтому чаще всего они решаются численно с использованием ЭВМ.

При перфузионном моделировании удаётся обычно достигнуть более адекватного описания фармакокинетики лекарственного препарата, чем на основе «классических» камерных моделей. Однако при перфузионном моделировании необходимо учитывать целый ряд физиологических характеристик лекарственного препарата, которые обычно являются неизвестными. Поэтому использование перфузионных моделей в настоящее время ограничено.

В качестве иллюстрации рассмотрим физиологическую модель распределения билигноста [9]. Для моделирования каждый орган представляли в виде двух камер: крови ($V_{\text{к}i}$) и собственно ткани ($V_{\text{т}i}$). Предполагали, что: скорость поступления ЛВ в ткань ограничивается скоростью кровотока, равновесие между свободной формой ЛВ в крови и ткани устанавливается мгновенно, связывание ЛВ линейно зависит от его концентрации. Тогда для любой из камер скорость накопления ЛВ определяется скоростями притока артериальной крови, оттока с венозной кровью и элиминации ЛВ:

$$\frac{d(V_{\text{к}i}C^0_{\text{к}i})}{dt} + \frac{d(V_{\text{т}i}C^0_{\text{т}i})}{dt} = Q_{\text{т}i}(C_{\text{т}i} - C^0_{\text{т}i}). \tag{28}$$

Для того чтобы учесть связывание ЛВ с белками, соотношение общей и свободной концентраций ЛВ описывали уравнениями

$$\text{для крови:} \quad C^0_{\text{к}i} = F_{\text{к}}C^F_{\text{к}i}, \tag{29}$$

$$\text{для ткани:} \quad C^0_{\text{т}i} = F_{\text{т}}C^F_{\text{т}i}, \tag{30}$$

где $F_к$ — коэффициент распределения ЛВ кровь — физиологический раствор; $F_т$ — коэффициент распределения ткань — физиологический раствор.

С учётом формул (29), (30) уравнение (28) преобразуется к следующему виду:

$$(V_к F_к + V_т F_т)\frac{dC_{кi}^F}{dt} = Q_{тi} F_к (C_{B,i}^F - C_{кi}^F). \qquad (31)$$

Уравнение (31) описывает динамику накопления ЛВ во всех органах, кроме крови. Для крови соответствующее уравнение выглядит следующим образом:

$$V_к F_к \frac{dC_B^F}{dt} = F_к \left(\sum_{i=1}^{n-1} C_{кi} Q_{тi} - C_B^F Q_B \right), \qquad (32)$$

где n — общее число камер, входящих в модель.

Для определения параметров модели использованы данные таблиц 2.17, 2.18. Как показал расчёт, кинетика распределения билигноста хорошо согласуется с экспериментальными данными (табл. 2.19). Таким образом, перфузионная модель позволяет адекватно описывать фармакокинетику билигноста до его введения.

Таблица 2.17

Физиологические параметры белой крысы массой 200 г [20]

Орган или ткань	Объём кровеносного русла, мл	Объём ткани, мл	Скорость кровотока, мл/мин
Кровь	4,925	—	44,994
Головной мозг	0,453	1,987	0,631
Щитовидная железа	0,0022	0,0098	0,0195
Почки	0,514	1,237	7,30
Сердце	0,140	0,450	1,15
Мышцы	2,596	110,750	20,89
Печень	1,481	6,893	3,14
Желудочно-кишечный тракт	0,541	15,039	8,59
Жировая ткань	0,032	4,008	0,46
Остальные ткани	2,53	45,150	2,815

Таблица 2.18

Значения коэффициента $F_т$ для срезов органов [9]

Орган или ткань	$F_т$	Орган или ткань	$F_т$
Печень	1,35	Головной мозг	0,61
Почки	1,16	Жировая ткань	0,71
Сердце	1,59	Щитовидная железа	5
Мышцы	2,01	Кровь	63

Таблица 2.19

Кинетика распределения ^{125}I-билигноста в органах и тканях крысы после инъекции 350 мг/кг препарата. Верхние цифры — расчёт, нижние цифры — эксперимент (% радиоактивности по отношению к радиоактивности, инъецированной на 1 г массы животных)

Орган или ткань	Время после введения, мин				Коэффициент корреляции
	5	15	30	60	
Цельная кровь	20,0	13,2	8,59	5,00	0,985
	326 ± 4,8	179 ± 9	90 ± 1,9	67 ± 1	
Печень	32,3	55,1	24,5	12,9	0,956
	249 ± 7,5	446 ± 13,4	284 ± 8	146 ± 6	
Сердце	0,62	0,407	0,265	0,154	0,927
	80 ± 13,5	34 ± 0,4	27 ± 0,1	24 ± 0,5	
Головной мозг	2,05	1,33	0,862	0,497	0,977
	7,2 ± 0,7	7,7 ± 0,2	6 ± 0,1	3,5 ± 0,06	

2.10. Многократное введение лекарственного вещества. Фармакокинетическая оптимизация терапии

До настоящего времени мы предполагали, что ЛВ вводится в организм человека или экспериментального животного однократно. Однако в реальных условиях может потребоваться длительная терапия, т. е. возникнет необходимость многократного введения ЛВ. При многократном введении ЛВ может наблюдаться индукция/ингибирование ферментов, метаболизирующих ЛВ, что приводит к изменению скорости элиминации ЛВ. Чаще всего это касается антигипертензивных ЛВ, в том числе диуретиков и антиангинальных средств, противоэпилептических и противопаркинсонических препаратов, противомикробных средств.

Даже если параметры метаболизма ЛВ не изменяются, очень важно подобрать кратность введения ЛВ и его дозировку с тем, чтобы концентрация ЛВ в любой момент времени находилась в терапевтическом диапазоне (рис. 2.35). При этом

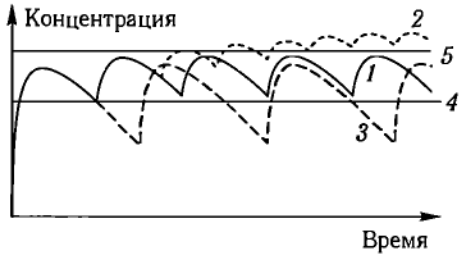


Рис. 2.35. Различные варианты изменения концентрации ЛВ в организме: *1* — оптимальное изменение; *2* — кумуляция ЛВ; *3* — введение ЛВ в низкой дозе или редкое введение ЛВ; *4* — минимальная терапевтическая концентрация; *5* — минимальная токсическая концентрация

слишком частое введение ЛВ или назначение чрезмерно больших доз приводит к избыточному накоплению ЛВ в организме, в результате концентрация ЛВ превышает минимальную токсическую и развиваются токсические осложнения терапии. Если ЛВ назначается слишком редко или в чрезвычайно малых дозах, то между

введениями ЛВ его концентрация становится меньше минимальной терапевтической, т. е. ЛВ не действует, что приводит к снижению эффективности терапии.

Подбор режима введения и дозировки ЛВ с целью повышения эффективности терапии и снижения числа побочных эффектов называется оптимизацией терапии. В простейшем случае требуется, чтобы во всё время терапии концентрация ЛВ находилась в терапевтическом диапазоне: превышала минимальную терапевтическую и была ниже минимальной токсической. В общем случае можно потребовать минимизации/максимизации площади под фармакокинетической кривой, минимизации суммарной введённой дозы ЛВ (для снижения стоимости лечения) и т. п.

Наиболее целесообразно проведение фармакокинетической оптимизации лечения в следующих случаях:

1. У больных в тяжёлом состоянии, когда терапевтический эффект может быть достигнут только за счёт применения максимальных дозировок препаратов. В этом случае значительно сужается терапевтический диапазон и увеличивается вероятность проявления побочного действия лекарственных препаратов. В первую очередь это относится к цитостатиткам и антибиотикам.

2. Купирование острых состояний. При этом вначале препараты вводятся в ударных (максимально допустимых) дозах, а затем проводится длительная поддерживающая терапия. К таким препаратам относятся: сердечные гликозиды, бронхолитики, гормоны, антиконвульсанты.

3. Использование препаратов, передозировка которых сопровождается угнетением жизненно важных центров — сосудодвигательного и дыхательного (средства для наркоза).

4. Длительное использование ЛВ, особенно на фоне тяжёлых органических заболеваний. При этом следует отметить, что длительное назначение лекарственных препаратов может приводить к изменению их биотрансформации и кумуляции ЛВ и их метаболитов в организме. В этом случае речь идёт об антигипертензивных, в том числе диуретиках, и антиангинальных средствах, противоэпилептических и противопаркинсонических препаратах, противомикробных средствах.

Для корректной фармакокинетической оптимизации лечения при первом приёме лекарственного препарата проводят определение индивидуальных фармакокинетических параметров. Если лекарственный препарат применяется длительно, то для определения индивидуальных фармакокинетических параметров его приём отменяется на несколько дней. Длительность отмены ЛВ определяется его средним временем полувыведения (справочная величина): если бы индивидуальное время полувыведения соответствовало среднему, то за время отмены должно было быть выведено количество препарата, вдвое превышающее его последнюю дозу. Возможно экспериментальное определение времени отмены: препарат отменяется до тех пор, пока он не перестаёт обнаруживаться в исследуемой ткани.

При первом введении препарата могут решаться следующие вопросы:

— выбор фармакокинетической модели;

— определение индивидуальных фармакокинетических параметров [26].

Следует заметить, что выбор фармакокинетической модели требует большего числа экспериментальных данных, чем задача определения индивидуальных фармакокинетических параметров в рамках заданной фармакокинетической модели. Показано, что для многих лекарственных препаратов достаточно однократного определения основных фармакокинетических параметров, которые могут быть в дальнейшем успешно использованы для длительной фармакокинетической коррекции лечения. Это связано с тем, что в течение длительного времени (не менее 1 года) эти параметры практически не изменяются. Для большинства антибиотиков фармакокинетические

параметры приблизительно одинаковы у всех людей без нарушения функций печени и почек.

Рассмотрим некоторые практические вопросы фармакокинетичекой оптимизации лечения.

На рис. 2.36 представлена фармакокинетическая зависимость концентрации ЛВ от введённой дозы для однокамерной модели со всасыванием. Как следует из ри-

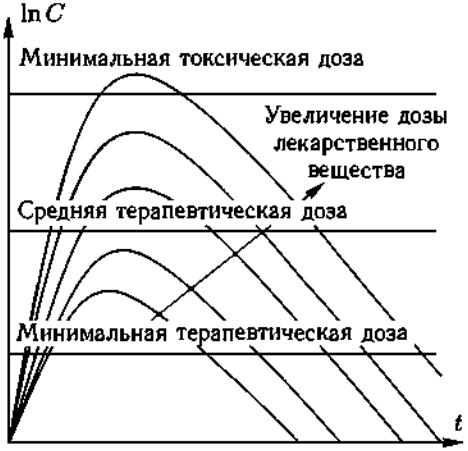


Рис. 2.36. Зависимость концентрации лекарственного вещества в камере от введённой дозы (однокамерная модель со всасыванием)

сунка, при увеличении введённой дозы ЛВ возрастает его концентрация в камере. При этом важным свойством линейных фармакокинетических моделей является линейная связь между дозой ЛВ и его максимальной концентрацией в камере. Следовательно, увеличивая или уменьшая дозу введённого лекарственного препарата, можно повышать или снижать его концентрацию в камере. В соответствии с этим подбирают первую дозу вводимого препарата. Вторая доза препарата подбирается так, чтобы концентрация препарата в камере никогда не была меньше минимальной терапевтической (рис. 2.37). При этом легче всего подобрать режимы введения фармакологического препарата с помощью ЭВМ. Аналогичным образом подбираются третья, четвёртая и т. д. дозы

Следует заметить, что увеличение числа введений лекарственного вещества позволяет более плавно изменять его концентрацию в камере и увеличивать суммарное время действия препарата (рис. 2.38). Как правило, постепенное изменение концентрации ЛВ в камере позволяет уменьшить вероятность возникновения осложнений и приводит к более быстрому достижению терапевтического эффекта.

Следует заметить, что стремление поддерживать концентрацию ЛВ на постоянном уровне в пределах терапевтического диапазона основано на результатах опытов *in vitro*. В клеточной культуре антибиотики тормозят рост микроорганизмов и не препятствуют росту культуры в узком диапазоне концентраций. Уменьшение концентрации ниже определённого уровня приводит к росту микроорганизмов, увеличение концентрации — к гибели клеточной культуры. При этом в узком диапазоне доз увеличение концентрации антибиотиков приводит к более эффективному торможению роста микроорганизмов.

Одна из основных задач фармакокинетической оптимизации лечения — подбор интервалов между введениями ЛВ при его курсовом назначении. Интервалы между



Рис. 2.37. Схема повторного назначения лекарственного препарата (однокамерная модель со всасыванием): *1* и *2* — номера введения

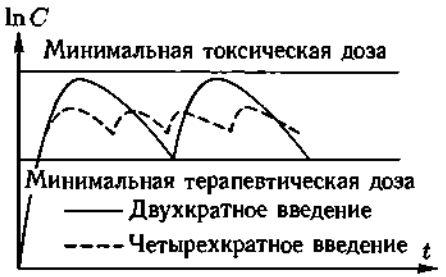


Рис. 2.38. Изменение концентрации лекарственного вещества в камере при различных режимах введения (однокамерная модель со всасыванием)

введениями лекарственного препарата (Δt) зависят от времени его полувыведения ($t_{1/2}$) и от предполагаемой интенсивности проводимой терапии. Как было показано выше, если $\Delta t = t_{1/2}$, то за время между приёмами лекарственного препарата его концентрация в крови уменьшится вдвое. Если $\Delta t = 2^m t_{1/2}$, то за время между приёмами лекарственного препарата его концентрация в крови уменьшится в m раз.

Выбор $\Delta t < t_{1/2}$ обеспечивает поддержание концентрации ЛВ на максимально высоком уровне. Столь часто антибактериальные препараты назначают при проведении интенсивной терапии. Данный режим чрезвычайно опасен развитием токсических осложнений из-за кумулятивных эффектов лекарственных средств. Поэтому чаще всего ЛВ назначают в режиме

$$1 - 2t_{1/2} \leqslant \Delta t \leqslant 3 - 4t_{1/2}. \qquad (33)$$

Данный режим позволяет поддерживать концентрацию ЛВ в терапевтическом диапазоне с минимальным риском развития токсических осложнений. Более редкое назначение лекарств обычно приводит к тому, что концентрация ЛВ становится меньше минимальной терапевтической и перестаёт проявляться их терапевтическое воздействие.

Проведём, к примеру, фармакокинетическую оптимизацию назначения ампициллина натрия ($t_{1/2} = 1$ ч). Следовательно, интервал $\Delta t = 2^2 t_{1/2} = 4$ ч (введение 8 раз в день) предназначен для интенсивной терапии тяжёлых инфекций, а интервал $\Delta t = 2^3 t_{1/2} = 8$ ч (введение 4 раза в день) — для терапии инфекционных заболеваний средней тяжести.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 2

1. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.* Молекулярная биология клетки. — М: Мир, 1994. 2. С. 93–253.
2. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — 720 с.
3. *Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В.* Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М.: Изд-во МГУ, 1982. — 345 с.
4. *Гуревич К.Г.* Классификация и фармакокинетический анализ зависимостей доза–эффект // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2001. № 2. С. 9–14.
5. *Горьков В.А.* Концепции и концептуальные модели психофармакологии // Вестник РАМН. 1996. № 4. С. 51–54.
6. *Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д.* Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. — М.: Изд-во МГУ, 1993. — 255 с.
7. *Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н.* Фармакокинетика. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. — 383 с.
8. *Лакин К.М., Крылов Ю.Ф.* Биотрансформация лекарственных веществ. — М.: Медицина, 1981. — 342 с.
9. *Мануйлов К.К.* Изученние фармакокинетики билигноста // Фармакология и токсикология. 1986. № 3. С. 83–86.
10. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. — 384 с.
11. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Гуревич К.Г., Ухина Т.В.* Механизмы формирования различных зависимостей доза–эффект для эстрогенов // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35, № 9. С. 6–7.
12. *Соловьёв В.Н., Егоренко Г.Г., Фирсов А.А.* Использование математической модели для изучения печёночной функции у крыс альбиносов методом сульфобромфталеинового теста // Лабораторное дело. 1976. № 9. С. 538–542.
13. *Соловьёв В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А.* Фармакокинетика. — М.: Медицина, 1981. — 424 с.
14. *Фисенко В.П., Арзамасцев Е.В., Бабаян Э.А. и др.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — 398 с.
15. *Шимановский Н.Л.* Транспортные системы лекарственных веществ и химические принципы их функционирования. В кн. Биохимическая фармакология / Под ред. П.В. Сергеева. — М.: Высшая школа, 1982. С. 78–93.
16. *Barnard R., Wolff R.* Analysis and application of an equilibrium model for in vitro bioassay systems with three components: receptor, hormone and hormone-binding-protein // J. Theor. Biol. 1998. V. 190. P. 333–339.
17. *Bischoff K.B., Dedrick R.L., Zanarko D.S., Longstreth J.A.* Methotrexate pharmacokinetics // J. Pharmacol. Sci. 1971. V. 60. P. 1128–1133.
18. *Bratter D.C., Chennavasin P., Dehmer G.J.* Prolonged hemodynamic effect of furosemide in congestive heart failure // Am. Heart J. 1984. V. 108. P. 1031–1032.
19. *Breckenridge A.M.* Decision-making in the development of new drugs // J. Hypertens. Suppl. 1985. V. 3. P. S. 51–S. 5.
20. *Fang S.-M., Janes J.O., Nalson J.A., Liou J.-F.* Physiologic pharmacokinetic model of iopanoic acid metabolism in rats // Invest. Radiol. 1981. V. 16. P. 330–336.

21. *Jaehde U., Sorgel F., Naber K.G. et al.* Distribution kinetics of enoxacin and its metabolite oxoenoxacin in excretory fluids of healthy volunteers // Antimicrob. Agents Chemother. 1995. V. 39, № 9. P. 2092–2097.
22. *Jelliffe R.W., Maire P., Sattler F. et al.* Adaptive control of drug dosage regimens: basic foundations, relevant issues, and clinical examples // Int. J. Biomed. Comput. 1994. V. 36. P. 1–23.
23. *Jelliffe R., Iglesias T., Hurst A. et al.* Individualising gentamicin dosage regimens. A comparative review of selected models, data fitting methods and monitoring strategies // Clin. Pharmacokinet. 1991. V. 21. P. 461–478.
24. *Jelliffe R.W., Schumitzky A.* Modeling, adaptive control, and optimal drug therapy // Med. Prog. Technol. 1990. V. 16. P. 95–110.
25. *Ritschell W.A., Hammer G.W.* Prediction of the volume of distribution from in vitro data and use for estimating the absolute extent of absorption // Int. J. Clin., Pharmacol. Ther. Toxicol. 1980. V. 18. P. 298–316.
26. *Sheiner L.B., Beal S., Rosenberg B. et al.* Forecasting individual pharmacokinetics // Clin. Pharmacol. Ther. 1979. V. 31. P. 294–305.
27. *Stephens R.L., Williamson S.K., Jackon W.L.* Methotrexate cerebrospinal fluid pharmacokinetics in a patient with lymphoma treated with methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, and dexamethasone // Am. J. Med. 1986. V. 81. P. 718–720.
28. *Veldhuis J.D., Johnson M.L., Faunt L.M. et al.* Influence of the high-affinity growth hormone (GH)-binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH. Modeling analysis and clinical applications // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 629–641.
29. *Welling P.A., Linshaw M.A.* Importance of anion in hypotonic volume regulation of rabbit proximal straight tubule // Am. J. Physiol. 1988. V. 255. P. F853–F860.

Глава 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Открытие фармакологической активности ацетилхолина (АХ) связано с работами, проводимыми с надпочечниками. В 1900 г. было обнаружено, что после удаления из экстрактов надпочечников адреналина, они (экстракты) не только теряли способность повышать артериальное давление у экспериментальных животных, но даже, наоборот, снижали его. Исследователи поначалу приписали этот эффект холину, однако позднее предположили, что в экстрактах должно содержаться вещество, более активное, чем холин. При исследовании производных холина было выявлено, что его ацетилирование приводит к увеличению способности соединения снижать артериальное давление более чем в 100 000 раз. Этот результат позволил предположить, что АХ присутствует в тканях, хотя его физиологическая роль так и оставалась неясной.

Изучая фармакологическую активность АХ, Дейл в 1914 г. установил, что его эффекты схожи с действием мускарина, ядовитого вещества, содержащегося в грибах *Amanita muscaria*, и никотина, алкалоида, получаемого из листьев табака. Мускариноподобное действие проявлялось в снижении артериального давления и эффектах, аналогичных эффектам возбуждения парасимпатической нервной системы на внутренние органы, и блокировалось атропином, ядовитым алкалоидом, содержащимся в паслёне. Введение на фоне атропина больших доз АХ вызывало появление эффектов, схожих с действием никотина: 1) возбуждение всех автономных ганглиев, 2) возбуждение скелетных мышц, 3) стимуляцию секреции надпочечниками адреналина. Возбуждение симпатических ганглиев и секреция адреналина приводили к повышению артериального давления.

После установления роли АХ в межнейронной передачи в автономных ганглиях была выявлена гетерогенность синапсов, в которых медиатором является АХ, в соответствии с их избирательной чувствительностью к мускарину и никотину, т. е. существование М- и Н-реактивных синапсов. К М-реактивным были отнесены синапсы 1) в области окончаний всех парасимпатических постганглионарных нервов и 2) симпатических окончаний, иннервирующих потовые железы. К Н-реактивным — синапсы в области 1) окончаний всех преганглионарных волокон, 2) окончаний симпатических нервов, идущих к хромаффинным клеткам надпочечников, которые имеют то же эмбриологическое происхождение, что и симпатические постганглионарные нейроны, и 3) окончаний двигательных нервов поперечно-полосатых мышц [1, 2].

Также было показано, что АХ осуществляет межнейронный контакт в некоторых образованиях ЦНС (М- и Н-реактивные).

По способу передачи сигнала холинергические межнейронные и нервно-мышечные синапсы принципиально не отличаются от синапсов, в которых медиаторами служат моноамины (норадреналин, дофамин, серотонин). Передача сигнала включает в себя следующие основные этапы:

1) захват предшественников медиатора нервными окончаниями;
2) синтез медиатора в нервных окончаниях;
3) депонирование медиатора и хранение его в везикулах;
4) деградация избытка медиатора в нервных окончаниях;

5) деполяризация пресинаптического окончания распространяющимся потенциалом действия;

6) вход Ca^{2+} в ответ на деполяризацию пресинаптической мембраны;

7) высвобождение квантовых количеств медиатора в синаптическую щель;

8) диффузия медиатора к постсинаптическим рецепторам;

9) взаимодействие медиатора с постсинаптическими и пресинаптическими рецепторами и формирование ответа на эффекторных клетках;

10) инактивация медиатора в синаптической щели;

11) обратный захват медиатора или продуктов его деградации пресинаптическими окончаниями.

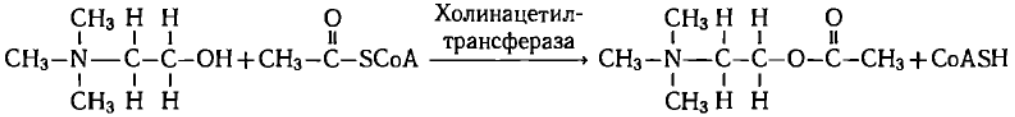
В холинергических синапсах наиболее полно изучены и фармакологически регулируются стадии захвата предшественника (холина), синтеза и высвобождения АХ, обратного захвата продуктов деградации медиатора и взаимодействия его с рецепторами. Фармакологические вещества, регулирующие пресинаптические процессы, а также деградацию АХ в синаптической щели, образуют группу непрямых холинергических средств. Фармакологические вещества, взаимодействующие непосредственно с рецепторами, образуют группу прямых холинергических средств, разделяющуюся на вещества, активирующие рецепторы и воспроизводящие действие на них АХ (холиномиметики), и вещества, ингибирующие рецепторы и препятствующие взаимодействию их с АХ (холиноблокаторы) [3–11].

3.1. Синтез и высвобождение ацетилхолина

АХ синтезируется в окончаниях холинергических нейронов из спирта холина, который захватывается нервными окончаниями с помощью двух транспортных систем. Транспортные белки одной системы обладают низким сродством к холину ($K_м = 10^{-4}$ М) и не имеют топографической связи с холинергическими нейронами, они присутствуют во всех типах клеток и служат для транспорта холина, необходимого для синтеза фосфолипидов мембран — фосфатидилхолина (лецитина). Это так называемая система экстранейронального захвата.

Вторая система захвата топографически связана с окончаниями холинергических нейронов и обладает высоким сродством к холину ($K_м = 10^{-6}$ М), что позволяет эффективно захватывать холин из синаптической щели. Концентрация холина в плазме крови и интерстициальной жидкости составляет 10^{-5} М, однако непосредственно вблизи окончания вследствие гидролиза АХ ацетилхолинэстеразой (АХЭ) постсинаптической мембраны концентрация холина возрастает до 10^{-3} М. Наличие двух транспортных систем приводит к тому, что примерно 50% холина из синаптической щели захватывается обратно нервным окончанием.

Свободный холин внутри нервного окончания ацетилируется цитозольным ферментом холинацетилтрансферазой. Донором ацетильных групп является ацетилкоэнзим А (ацетил-CoA):



Ацетил-CoA является конечным продуктом гликолиза, он образуется в митохондриях при окислительном декарбоксилировании пирувата, и его концентрация в цитоплазме нервного окончания достаточна высока, чтобы обеспечить ацетилирование холина.

Холинацетилтрансфераза — белок с молекулярной массой 65 кД, который может быть растворён в цитоплазме или в разной степени связан с мембранами внутриклеточных структур. Фермент синтезируется в теле нейрона и передаётся в нервное окончание системой быстрого аксонального транспорта со скоростью 190 мм в сутки (показано на *n. vagus* кролика). Время полужизни фермента велико и составляет около 20 сут.

Поскольку холинацетилтрансфераза и ацетил-СоА присутствуют в нервном окончании в избыточном количестве, фактором, лимитирующим синтез АХ, является концентрация холина. Поэтому скорость синтеза АХ в окончании возрастает по мере его гидролиза в синаптической щели.

Большая часть АХ «упаковывается» в везикулы, где его концентрация очень высока и достигает 100 мМ. АХ депонируется путём активного транспорта. Для этого в мембране везикулы существует специальный спиралеобразный белок-переносчик, который делает в мембране 12 витков. Подобные белки существуют в мембранах везикул и на пресинаптических мембранах во всех синапсах, в которых медиаторами являются моноамины. Депонирование АХ осуществляется за счёт высокого электрохимического градиента протонов, который существует по обе стороны мембраны везикулы. Высокая концентрация протонов внутри везикулы обеспечивается за счёт работы H^+-АТФазы. Белок-переносчик обменивает протоны на молекулы АХ, Известен ингибитор этого белка — это везамикол, применение которого в эксперименте вызывает блок АЭ-синапса.

Помимо медиатора, в везикулах содержится большое количество АТФ, молярное соотношение которого с содержанием АХ равно 1 : 5.

Не связавшийся везикулами АХ подвергается внутри нервного окончания гидролизу холинэстеразой. Свободный АХ частично может диффундировать в синаптическую щель. Однако основным механизмом выделения АХ, который приводит к формированию постсинаптического потенциала действия, является экзоцитоз, при котором мембрана везикулы на какое-то время сливается с пресинаптической мембраной, раскрывается и её содержимое выходит в синаптическую щель.

Необходимым условием для экзоцитоза является деполяризация нервного окончания. В нейроне деполяризация мембраны происходит вследствие открытия потенциалзависимых Na^+-каналов, что вызывает открытие потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов и обеспечивает вход Ca^{2+} в нервное окончание. Места прикрепления нагруженных пузырьков к внутренней стороне клеточной мембраны тесно связаны с Ca^{2+}-каналами, поэтому открытие этих каналов и поступление Ca^{2+} в клетку является сигналом для открытия везикулы.

В нервно-мышечном окончании один нервный импульс приводит к высвобождению содержимого около 300 везикул, что соответствует приблизительно 3 млн молекул АХ. Мембраны везикул впоследствии «отшнуровываются» и путём эндоцитоза образуют пузырьки для повторного использования в качестве контейнера для медиатора. Этот цикл занимает несколько минут и контролируется белками плазматической мембраны (синаптотаксины), везикул (синаптобревины и синаптотагмины), а также цитозольными белками. Некоторые из этих белков имеют Ca^{2+}-связывающие участки, что определяет связь экзоцитоза с поступлением Ca^{2+} в клетку. Эти белки являются перспективным объектом с точки зрения создания лекарств, для которых они явились бы мишенью действия. В настоящее время известны только природные токсины, инактивирующие эти белки (см. ниже).

Однако описанная схема выделения АХ в действительности не столь уж проста. Существуют данные, согласно которым из синаптических пузырьков может выходить только часть их содержимого. Показано также, что АХ может выделяться не из везикул, а выходить из цитоплазмы при помощи белков-переносчиков.

3.1.1. Фармакологическая регуляция синтеза ацетилхолина. Поскольку лимитирующей стадией в синтезе АХ является поступление холина в нервное окончание, то и действие фармакологических агентов должно быть направлено на белки систем захвата холина, главным образом нейронального. В настоящее время известны два вещества, ингибирующие транспорт предшественника медиатора в клетку, — гемихолин и триэтилхолин, которые не применяются в клинике, но используются как инструмент в экспериментальных исследованиях. По химической структуре оба этих вещества являются производными холина.

По механизму действия гемихолин является конкурентным ингибитором систем захвата холина, хотя при этом сам он не захватывается нервными окончаниями. Триэтилхолин, конкурируя с АХ за системы обратного захвата, поглощается нервным окончанием, где по аналогии с холином ацетилируется холинацетилтрансферазой. Образовавшийся ацетилтриэтилхолин депонируется в везикулах и выделяется в ответ на стимуляцию нерва, т. е. является «ложным» медиатором.

Гемихолин и триэтилхолин ингибируют синтез АХ во всех периферических холинергических нейронах, не влияя на проводимость в холинергических синапсах ЦНС, так как из-за наличия в их структуре четвертичного атома азота они находятся при физиологических значениях pH в ионизированном состоянии и плохо проникают через ГЭБ. Фармакологический эффект ингибиторов синтеза АХ развивается медленно и обратим, поскольку снимается холином.

3.1.2. Фармакологическая регуляция высвобождения ацетилхолина. Поскольку высвобождению АХ под действием нервного импульса предшествуют деполяризация пресинаптической мембраны и вход внеклеточного Ca^{2+} в нервное окончание, то все вещества, препятствующие деполяризации, входу Ca^{2+} и конкурирующие с Ca^{2+} за связывающие центры акцепторов, будут ингибировать высвобождение медиатора.

Местные анестетики, например прокаин (новокаин), будучи ингибиторами потенциалзависимых Na^+-каналов, предотвращают деполяризацию и тем самым ингибируют высвобождение АХ. Антибиотики группы аминогликозидов (стрептомицин, неомицин), ингибируя потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы, также препятствуют высвобождению АХ. Поэтому у антибиотиков группы аминогликозидов в качестве нежелательного побочного эффекта иногда наблюдается паралич скелетных мышц, который можно снять введением ионов Ca^{2+}. Интересно, что более специфические ингибиторы Ca^{2+}-каналов, такие как верапамил и нифедипин, практически не влияют на высвобождение АХ. Отсутствие такой активности у этой группы ЛС можно объяснить гетерогенностью α-субъединиц потенциалзависимых Na^+-каналов.

Ингибирующим действием на экзоцитоз обладают и ионы Mg^{2+}. Внутривенное введение солей Mg^{2+} действительно приводит к ингибированию высвобождения АХ как в синапсах ЦНС, так и на периферии.

Однако действие всех вышеупомянутых ингибиторов высвобождения АХ является неизбирательным по отношению к холинергическим нервным окончаниям, так как эти агенты, блокируя деполяризацию нервного окончания и ингибируя вход Ca^{2+}, тормозят экзоцитоз во всех моноаминергических синапсах.

Избирательными ингибиторами пресинаптических мембран холинергических синапсов являются токсин ботулинуса и β-бунгаротоксин.

Токсин ботулинуса принадлежит к группе мощных бактериальных токсинов, в которую входят также столбнячный и дифтерийный токсины. Это — белок, продуцируемый анаэробными бациллами *Clostridium botulinum*, способными размножаться в консервированной пище. Токсин сильнодействующий: минимальная летальная доза для мыши составляет 10^{-12} г, т. е. всего несколько миллионов молекул, поэтому

этот токсин является причиной чрезвычайно опасных отравлений. Он связывается исключительно с ХЭ нервными окончаниями, и, как посчитано, достаточно всего лишь нескольких молекул токсина на одно нервное окончание, чтобы вызвать полный блок синапса.

Токсин состоит из двух субъединиц, одна из которых избирательно связывается с ХЭ нервным окончанием. С помощью её токсин проникает в клетку, где уже вторая субъединица оказывает токсическое воздействие. Токсическое действие обусловлено компонентами A–G, обладающими пептидазной активностью, поэтому способными разрушать белки, участвующие в экзоцитозе и таким образом вызывать блок синапса. Каждый компонент токсина инактивирует свой белок.

Отравление токсином ботулинуса вызывает прогрессирующий паралич парасимпатической нервной системы, что проявляется вначале в сухости во рту, затруднении глотания, неясности видения, вслед за чем развивается паралич скелетных мышц, в том числе и дыхательных. Введение антитоксина бывает эффективным только до появления симптомов отравления. Если токсин связался с нервными окончаниями, остановить его действие невозможно. Поэтому смертность при отравлении токсином ботулинуса очень высокая, в случае благоприятного исхода восстановление функций занимает несколько недель.

Локальное введение токсина ботулинуса в мышцу используют для лечения блефароспазма и других видов спастичности мышц, а также в косметологии.

β-Бунгаротоксин — белок, содержащийся в яде змей семейства кобр. Он, как и токсин ботулинуса, избирательно связывается с холинергическими нервными окончаниями, но активным компонентом *β*-бунгаротоксина является не пептидаза, а фосфолипаза, разрушающее действие которой на фосфолипиды мембран нервного окончания и везикул полностью блокирует выделение медиатора.

Некоторые вещества обладают обратным действием — они способствуют выделению АХ в синаптическую щель. К таким веществам относятся тетраэтиламмоний и *4-аминопиридин*. Последний является наиболее сильным высвободителем медиатора, однако его действие неселективно по отношению к холинергическим синапсам: соединения, принадлежащие к группе аминопиридинов, усиливают выделение и других медиаторов. Неизбирательность действия 4-аминопиридина обусловлена блокадой потенциалзависимых K^+-каналов в мембране нейрона. Обычно при прохождении потенциала действия эти каналы открыты, что обеспечивает быструю реполяризацию мембраны. Блокада K^+-каналов вызывает пролонгирование потенциала действия, что позволяет большему количеству Ca^{2+} проникнуть в нервное окончание и способствует экзоцитозу содержимого большего количества везикул.

3.2. Холинорецепторы

Ещё со времён J. Langley (1907) было известно, что мышцы чувствительны к лекарственным препаратам, наносимым в область нервно-мышечных соединений (синапсов). С тех пор механизмы функционирования нервномышечных соединений исчерченных (поперечнополосатых) мышц позвоночных явились предметом многочисленных исследований и в настоящее время изучены наиболее подробно. Хорошо известно, что «приход» потенциала действия до окончания мотонейрона приводит к высвобождению ацетилхолина, который, действуя на наружную поверхность постсинаптической мембраны (т.е. мембраны миоцита), вызывает увеличение её проницаемости для Na^+, K^+ и Ca^{2+}. Тончайшее нервное волокно может возбудить значительно более крупное мышечное волокно, потому что одна молекула ацетилхолина индуцирует перенос через постсинаптическую мембрану заряд приблизительно 10 000 ионов. Вначале было предположено, а затем доказано, что механизм данного уси-

ления заключается во взаимодействии агониста с ацетилхолиновыми рецепторами, которые не только узнают ацетилхолин на наружной поверхности постсинаптических мембран, но и обеспечивают также захват и перенос катионов через мембраны.

Кроме того, рецепторы, чувствительные к ацетилхолину, были найдены во многих гладкомышечных органах и в ЦНС. Используя различные фармакологические и биохимические подходы, многие исследователи получили данные о гетерогенности, локализации и физико-химических свойствах холинорецепторов. Общепринято, что ацетилхолин как нейромедиатор периферической и центральной нервной системы взаимодействует с двумя видами холинорецепторов: мускариновыми и никотиновыми, отличающихся между собой специфичностью и способностью отвечать на воздействие ряда агонистов и антагонистов (М-холинорецепторы избирательно возбуждаются мускарином, а Н-рецепторы — никотином).

При возбуждении М-холинорецепторов развиваются такие эффекты, как сокращение ресничной мышцы, миоз, снижение внутриглазного давления, активация перистальтики желудка и кишечника, стимуляция секреции слёзных, слюнных, желудочных и поджелудочной желёз, сокращение неисчерченных (гладких) мышц бронхов и мочевого пузыря, брадикардия, уменьшение сердечного выброса, гипотензия, десинхронизация ЭЭГ, а при возбуждении Н-холинорецепторов — возникновение потенциала действия в концевой пластинке и в ганглиях, стимуляция дыхательного и сосудодвигательного центров, высвобождение катехоламинов и др.

Физиологически важным различием между М- и Н-холинорецепторами является скорость их ответа. Считается, что никотиновые рецепторы предназначены опосредовать быстрые и непродолжительные эффекты и не способны суммировать во времени ответы на последовательные нервные импульсы, а мускариновые рецепторы, наоборот, реагируют длительно и медленно. Продолжительность реакции превосходит интервал между последовательными импульсами, осуществляя тем самым суммирование ответов во времени, которое исключительно важно для обеспечения равномерного управления, например, скоростью сердечных сокращений.

Большую роль в выяснении нейрохимических механизмов функционирования холинорецепторов играют эксперименты по изучению зависимости активности агонистов и антагонистов от их структуры.

Ацетилхолин и ареколин возбуждают М- и Н-холинорецепторы, а мускарин, диметилацетилхолин, 5-метилфурметид, АСТМ, пилокарпин, F2268, метахолин, бетанехол, оксотреморин и ацеклидин — М-рецепторы, в то время как никотин, лобелин, фенилтриметиламмоний, эпибутидин и диметилфенилпиперазин (ДМПП) — только Н-холинорецепторы. Атропин, пиперазин и платифиллин блокируют М-холинорецепторы, d-тубокурарин и декаметоний — Н-холинорецепторы скелетных мышц, пирилен, триметафан и гексаметоний — Н-холинорецепторы ганглиев. Дитилин является деполяризующим миорелаксантом, а полипептид α-бунгаротоксин — необратимым блокатором Н-холинорецепторов скелетных мышц.

3.2.1. Н-холинорецепты. Известно, что Н-холинорецепторы гетерогенны. Можно выделить три подкласса этого рода рецепторов: 1) Н-холинорецепторы ганглиев вегетативной нервной системы; блокируются гексаметонием в низких концентрациях и слабо чувствительны к декаметонию; 2) Н-холинорецепторы нервно-мышечного синапса; блокируются декаметонием и α-бунгаротоксином в низких концентрациях и гексаметонием в высоких концентрациях; 3) Н-холинорецепторы хромаффинных клеток надпочечников; в равной степени блокируются гексаметонием и декаметонием, а также тубокурарином и атропином в высоких концентрациях, но не α-бунгаротоксином. Н-холинорецепторы надпочечников и ЦНС блокируются триметафаном.

Н-холинорецепторы электрических органов рыб и нервно-мышечных синапсов, кроме участков, связывающих ацетилхолин, имеют также участки связывания для местноанастезирующих препаратов или так называемые регуляторные участки.

В головном мозге мышей существуют два связывающих участка для ^{3}Н-тубокурарина и один связывающий участок для ^{3}Н-α-бунгаротоксина. Немеченые тубокурарин и никотин имели большее сродство к участкам, связывающим ^{3}Н-α-бунгаротоксин. У взрослых животных по сравнению с мышами, находящимися в раннем постнатальном периоде развития, число мускариноподобных связывающих участков и активность маркерного пресинаптического фермента холинацетил-трансферазы в головном мозге были больше, а число никотиноподобных связывающих участков — меньше.

Во всех современных отечественных руководствах по фармакологии при рассмотрении вопроса о Н-холинорецепторах приводятся сведения об их локализации на постсинаптических мембранах нейронов вегетативных ганглиев клеток, скелетных мышц, нейронов ЦНС, хромаффинных клеток надпочечников и на клетках синокаротидной зоны, которые опосредуют влияние ацетилхолина и его аналогов на ионную проницаемость постсинаптических мембран и тем самым на возникновение потенциала действия, сокращение мышечного волокна, высвобождения катехоламинов и др. Однако в последнее десятилетие появилось большое число работ, доказывающих существование Н-холинорецепторов также на пресинаптических мембранах постганглионарных волокон синаптической нервной системы, взаимодействуя с которыми Н-холиномиметики вызывают высвобождение адренергических нейромедиаторов. Ацетилхолин высвобождает эндогенный норадреналин из тканей сердца и селезёнки в таком количестве, которое можно измерить с помощью соответствующих биохимических методов. В то же время «истечение» медиатора из изолированных препаратов мышечной оболочки артерии и вены собаки и кролика, кишечника морской свинки или её семявыносящего протока можно определить только в том случае, если предварительно ввести радиоактивную метку в норадреналин, который накапливается в нервных окончаниях. Действуя через высвобождение катехоламинов, Н-холиномиметики вызывают увеличение частоты и силы сердечных сокращений, сокращений центральной артерии уха кролика, лёгочной артерии кролика. Таким образом, прямое действие ацетилхолина и его аналогов на гладкомышечные органы может маскироваться действием на них норадреналина, высвобождаемого ацетилхолином из синаптических нервных окончаний. Этот феномен необходимо учитывать при оценке спектра фармакологических реакций, индуцируемых Н-холиномиметиками.

Важно отметить, что никотиновые антагонисты могут влиять также на обмен катехоламинов в синаптическом ганглии.

Широкое распространение никотиновых холинорецепторов, которые локализуются на эфферентных и афферентных нейронах, в пре- и постсинаптических отделах, а также вне синапсов, свидетельствует о том, что этого рода рецепторы, возможно, представляют собой неотъемлемую часть мембраны аксона. Однако физиологическая роль пресинаптических Н-холинорецепторов в синаптической нервной системе пока не выявлена, несмотря на большое число попыток её найти. Согласно существующей по этому вопросу гипотезе «холинергического звена», ацетилхолин является первичным стимулом (холинергическое звено) высвобождения медиатора, который в итоге приводит к надпороговой постсинаптической стимуляции. Аргументами против этой теории служат следующие факты: ни блокада Н-холинорецепторов антагонистами никотина, ни отсутствие самих Н-холинорецепторов (опыты на сердце цыплёнка) не подавляют постганглионарную передачу. По нашему мнению, пресинаптические Н-холинорецепторы не являются главными детерминантами ганглионарной передачи или функции адренергического синапса, а оказывают модулирующее, регуляторное

влияние на эти структуры. В пользу этого предположения говорят данные о том, что гексаметоний частично тормозит нейрональную передачу через цилиарный и сердечные парасимпатические ганглии птиц и что при отравлении фосфорорганическими препаратами у больных, несмотря на лечение атропином, значительно повышена экскреция с мочой катехоламинов.

Кроме того, необходимо указать, что Н-холинорецепторы, локализованные в ЦНС (полосатом теле крыс), высвобождают дофамин и серотонин.

Предполагается, что Н-холинорецепторы, присутствующие на дофаминергических и серотонинергических нервных окончаниях, модулируют процесс высвобождения этих нейромедиаторов.

Пока ещё не известна локализация Н-холинорецепторов ЦНС, опосредующих рвотный эффект никотина. Данный эффект не обусловлен высвобождением ацетилхолина, так как на его выраженность не влияет атропин.

При введении в желудочки головного мозга Н-холиномиметики вызывают также каталепсию и агрессивное поведение. Всё это указывает на присутствие Н-холинорецепторов в ЦНС и на необходимость дальнейшего изучения их физиологических и фармакологических свойств.

При изучении биохимических свойств Н-холинорецепторов полезной оказалась способность α-нейротоксинов змей необратимо с высокой специфичностью связываться с этими рецепторами. Эксперименты по изучению связывания α-бунгаротоксина, меченного флюоресцентной или радиоизотопной меткой, позволили установить, что в каждой концевой пластинке нормальной мышцы расположено от 10 до 20 млн молекул рецепторов. Плотность их упаковки на выступах складок постсинаптической мембраны составляет примерно 10 000 молекул на 1 мкм^2. В электрических органах плотность упаковки Н-холинорецепторов равна 5000 на 1 мкм^2.

Макромолекулу, связывающую α-бунгаротоксин из исчерченных мышц позвоночных, в водной среде растворить не удаётся, однако её можно легко отделить от мембран с помощью практически любого детергента. Оказалось, что данная макромолекула, прочно встроенная в мембрану, имеет белковую природу, а в её активном центре содержатся SH-группы.

Было обнаружено, что введение ингибиторов протеаз в процессе очистки белка Н-холинорецепторов приводит к существенному увеличению молекулярной массы выделенных молекул. Для получения воспроизводимых результатов при изучении этих белков методом электрофореза в полиакриламидном геле оказалось необходимым также добавлять реагенты (в частности, фенилметилсульфонилфторид), предотвращающие сшивку субъединиц под действием тканевых ферментов. В электрическом органе скатов *Torpedo* и *Larcino* α-бунгаротоксин связывался с субъединицами с молекулярной массой около 42 000, 48 000, 59 000 и 65 000. Молекулярная масса рецепторной молекулы была равна 400 000–500 000. В состав рецепторной молекулы входят две α-субъединицы с молекулярной массой $\sim$40 000, одна β-субъединица (мол. масса $\sim$49 000), одна γ-субъединица (мол. масса $\sim$60 000) и одна δ-субъединица (мол. масса $\sim$67 000). Получается, что Н-холинорецептор состоит из пяти единиц, объединённых в олигомер.

В дополнение к белку, связывающему ацетилхолин, рецептор из электрического органа *Torpedo*, содержит также другой класс макромолекул — модуляторов ионной проводимости. При изучении связывания специфического лиганда ионной проводимости ^{3}Н-пергидрогистриникотоксина было обнаружено, что белок-модулятор тесно ассоциирован с Н-холинорецепторами, но обычно отделяется от них при действии тритона Х-100. Таким образом, Н-холинорецептор, выделяемый с помощью этого детергента, по-видимому, представляет собой только часть природного комплекса холинорецептора и модулятора ионной проводимости. Химический анализ рецептор-

ных молекул показал, что в их состав входят сахара, в частности манноза, поэтому рецепторный белок следует рассматривать как гликопротеид.

По существующим представлениям, в рецепторной молекуле имеется четыре места связывания для α-бунгаротоксина и ацетилхолина.

Отметим, что Н-холинорецепторы из тканей беспозвоночных — мозга мух и головоногих имеют те же фармакологические и биохимические свойства, что и белки, связывающие α-бунгаротоксин из исчерченных мышц и электрических органов позвоночных. Однако, в отличие от позвоночных, комплексы белка с токсином из тканей беспозвоночных могут быть легко проэкстрагированы солевыми растворами при относительно нейтральных значениях pH. Этим объясняется то, что исследователи в основном изучают физико-химические свойства Н-холинорецепторов из указанных источников, так как их молекулярную массу и другие параметры можно определить с большей точностью, чем параметры покрытых детергентами комплексов из тканей позвоночных.

Как и следовало ожидать, исходя из структуры ацетилхолина, нейромедиатор действует лишь на структуры, обращённые в сторону синаптической щели. Эксперименты с заполненными ацетилхолином микроэлектродами показали, что деполяризация возникает только в том случае, если ацетилхолин вводят снаружи, а не внутрь мышечного волокна.

Установлено, что восстановители типа дитиотрейтола заметно снижают влияние холиномиметиков на рецепторы мышечных тканей, а окислители восстанавливают чувствительность Н-холинорецепторов. Эти данные и алкилирование свободных SH-групп Н-холинорецепторов, находящихся в заблокированном состоянии, производными N-этилмалеимида с четвертичной аммониевой группой, которая расположена на расстоянии около 1,2 нм от реакционноспособной двойной связи, дают основание предполагать, что в состав активного центра Н-холинорецепторов входит S–S-связь, расположенная на расстоянии 1,2 нм от центра (карбоксильная или фосфатная группа), взаимодействующего с четвертичной аммониевой группой агонистов.

Как следует из квантово-химических расчётов [1], положительный заряд ацетилхолина «размазан» по всем атомам катионовой головки, причём положительный заряд атомов водорода, контактирующих с молекулами окружения в холинорецепторе, несколько больше, чем заряд атомов водорода в углеводородах. Поэтому при взаимодействии катионовой головки ацетилхолина с анионным центром ацетилхолинового рецептора, представляющим собой гидрофобную область с отрицательно заряженными группами, определяющую роль играют кулоновские и Ван-дер-Ваальсовы силы.

Исходя из представлений о структуре Н-холинорецепторов и данных о взаимодействии дикатионов, имеющих различные N–N-расстояния, с Н-холинорецепторами нервно-мышечного синапса, предложена топография расположения субъединиц в тетрамерном холинорецепторе. Считается, что в образовании комплекса агонистов с Н-холинорецепторами большое значение имеет ионное электростатическое притяжение четвертичного атома азота к анионному центу холинорецептора. Дополнительную прочность этому комплексу придают Ван-дер-Ваальсовы контакты и диполь-дипольные связи с эстерофильными участками холинорецептора. Дикатионы с N–N-расстоянием порядка 2 нм (структура С-16) реагируют по диагонали квадрата. Здесь имеется возможность образовывать контакты как с анионными, так и с эстерофильными участками холинорецептора. В то же время дикатионы с N–N-расстоянием порядка 1,4 нм (структура С-10) реагируют по сторонам квадрата, а с эстерофильными участками контактов образовывать не могут.

В нашей стране с помощью аналога α-бунгаротоксина нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и его спин-меченых производных впервые удалось получить прямые экспериментальные данные об особенностях простран-

ственного строения не только самого токсина, но и ацетилхолинового рецептора, выделенного из электрического органа ската *Torpedo mormorata*. Данные ЭПР показали, что спиновая метка, связанная с остатком лизина в положении 44, экспонирована во внешнюю среду и не участвует в образовании токсин-рецепторного комплекса, но в связывании нейротоксина с рецептором принимает участие большое число заряженных и гидрофобных группировок нейротоксина. Связывание не сводится к проникновению центральной петли нейротоксина в некую полость в рецепторе, как это предполагали ранее. Напротив, нейротоксин накрывает рецептор значительной частью своей поверхности.

Благодаря жёсткости молекулы нейротоксина та часть молекулы, которая связывается с рецептором, может рассматриваться как «отражение» соответствующей поверхности рецептора, что даёт возможность оценить размеры участка рецептора, связывающего токсин. Эти размеры достаточно велики, учитывая, что расстояние между отдельными связывающими группировками токсина лежат в интервале 1,5–3,5 нм, а диаметр одной молекулы ацетилхолинового рецептора составляет 4–7,5 нм и на ней связываются две молекулы нейротоксина. Дальнейшие исследования были направлены на выяснение химической структуры субъединиц (α, β, γ, δ), образующих Н-холинорецептор, и их топографию. Оказалось, что Н-холинорецепторы электрического органа и скелетных мышц представляет собой пентамер, состоящий из α-, β-, γ- и δ-субъединиц в соотношении 2 : 1 : 1 : 1 соответственно. С возрастом выявлена возможность замены γ-субъединицы на ε-субъединицу, что изменяет биофизические свойства Н-холинорецепторов. У α-, β-, γ-, δ-субъединиц сходство в аминокислотной последовательности составляет около 40%, что свидетельствует о существовании одного общего исходного гена, который в процессе инволюции превратился в четыре разных, но близких по своему строению гена, кодирующих Н-холинорецепторы. Есть предположения, что Н-холинорецепторы представляют собой прототипы других рецепторов (возбуждающих и ингибирующих аминокислот, 5-HT_3-серотониновых рецепторов), которые формилируют ионные трансмембранные каналы.

Нейрональные Н-холинорецепторы в ЦНС также состоят из 5 субъединиц. С помощью метода клонирования их генов выявлена гетерогенность α-субъединиц (их обнаружено 8) и β-субъединиц (их обнаружено 3). Нейрональные Н-холинорецепторы имеют пре- и постсинаптическую локализацию. Они характеризуются различиями в селективности по отношению к проницаемости для ионов натрия и кальция, и не исключено, что их функция в ЦНС может заключаться не только в опосредовании быстрой транссинаптической передачи информации.

Биологическое значение олигомеризации холинорецептора, по-видимому, заключается в кооперативном характере его взаимодействия с ацетилхолином (облегчение связывания ацетилхолина с одной субъединицей после взаимодействия ацетилхолина с другой субъединицей).

Н-холинорецепторы локализованы в различных клетках с неодинаковой функцией и опосредуют трансформацию молекулярного сигнала ацетилхолина в каждом случае в специфический определённый физиологический ответ той или иной клетки. В нервно-мышечном синапсе Н-холинорецепторы опосредуют деполяризацию постсинаптической мембраны вследствие увеличения проницаемости для катионов и таким образом — сокращение скелетных мышц. В ЦНС Н-холинорецепторы регулируют функцию нейронов, в вегетативных ганглиях — опосредуют деполяризацию постганглионраных нейронов, а в мозговом слое надпочечников — секрецию катехоламинов.

Образование комплекса агонист–Н-холинорецептор сопровождается изменением проницаемости мембран для катионов.

Проведение целого комплекса фармакологических, биохимических и электронно-микроскопических исследований дало возможность постулировать, что белковые

субъединицы Н-холинорецепторов перекрывают всю толщу мембраны, значительно выступают над обоими слоями мембраны и образуют каналы, способные пропускать ионы. Гидрофобной поверхностью Н-холинорецептор контактирует с белками и липидами мембраны, а центральная часть рецепторов образована гидрофильными аминокислотными остатками и легко пропускает ионы. Считается, что в состоянии покоя ионные каналы, образуемые Н-холинорецепторами, закрыты. Для активации одного Н-холинорецептора необходимы по крайней мере две молекулы агониста, которые взаимодействуют с ним кооперативным образом. Вследствие конформационной перестройки, возникающей при взаимодействии ацетилхолина с выступающими из наружной поверхности клеток концами рецепторных молекул, каналы на несколько миллисекунд открываются для Na^+, K^+ и Ca^{2+}, что обеспечивает прохождение нескольких десятков тысяч ионов за одну миллисекунду. После активации рецепторные молекулы теряют на некоторое время чувствительность к агонистам (явление десенситизации).

Было замечено, что скорость исчезновения чувствительности зависит от концентрации действующего агониста. Этот процесс может протекать намного быстрее восстановления чувствительности. Однако скорость восстановления не зависит ни от концентрации агониста и его эффективности, ни от скорости исчезновения чувствительности.

Несомненно, что помимо этих реакций, происходящих на уровне агонист-рецепторных взаимодействий, на процесс исчезновения чувствительности могут влиять другие факторы, такие как поляризация мембраны и концентрация ионов.

В этой связи важно отметить, что 4-аминопиридин концентрационно-зависимым образом ингибирует десенситизацию рецепторов концевой пластинки диафрагмы крыс, вызываемую карбахолом. Кальций подавлял эффект 4-аминопиридина. Можно полагать, что 4-аминопиридин влияет на комплекс ацетилхолиновый рецептор — ионный канал или на липиды, окружающие этот канал в постсинаптической мембране концевой пластинки.

Как уже отмечалось, Н-холинорецепторы, кроме участков связывания агонистов, содержат другие регуляторные участки связывания, поэтому изучение влияния холинергических антагонистов и нейротоксинов на функцию Н-холинорецепторов позволяет получать новую информацию об Н-холинергических механизмах. Выявлено, что холинергические антагонисты, такие как атропин, гексаметоний и декаметоний, по неконкурентному механизму ингибируют Н-холинорецепторы вегетативных ганглиев, нервно-мышечных синапсов и хромаффинных клеток надпочечников. Гистриникотоксин, связываясь с Н-холинорецептором в участках, отличных от участков связывания агонистов, уменьшает ток ионов через рецепторные каналы. Этот агент неконкурентно ингибировал активацию Н-холинорецепторов нервно-мышечного синапса, выделенных из электрических органов рыб, и клеток мозгового вещества надпочечников быка.

Батрахотоксин, аконитин и вератридин в присутствии тетродотоксина ингибировали никотинстимулируемую секрецию катехоламинов из хромаффинных клеток надпочечников и проведение импульсов в нервно-мышечном синапсе. В норме никотин, взаимодействуя с Н-холинорецепторами, увеличивает ток Na^+ в клетку через тетродотоксинчувствительные каналы. Это приводит к деполяризации мембраны и активации входа Ca^{2+} в клетки. В среде без ионов Na^+ нейротоксины стимулируют секрецию катехоламинов и при отсутствии тетродотоксина. Яд скорпиона, который увеличивает вход Na^+ через тетродотоксинчувствительные каналы, не ингибирует стимулирующее действие никотина на секрецию катехоламинов. Поэтому можно считать, что ингибирующее влияние нейротоксинов на секрецию катехоламинов не

обусловлено их взаимодействием с нечувствительными к тетродотоксину натриевыми каналами, а связано с их действием на ионные каналы Н-холинорецептора.

Кроме того, эти эксперименты показали, что лимитирующим этапом эффекта никотина в данном случае является вход Ca^{2+} в клетку. Отметим, что зависимость от Ca^{2+} — непременное условие сопряжения активации Н-холинорецептора с физиологическим эффектом. Она обусловлена повышением проницаемости мембран для Ca^{2+}. Это справедливо и для препаратов двигательный нерв — скелетная мышца, и для постсинаптических Н-холинорецепторов в мозговом веществе надпочечников, и для нейронов вегетативных ганглиев. Хотя ещё точные механизмы сопряжения Н-холинорецепторов с процессами тока Ca^{2+} через мембраны во многом не изучены, уже сейчас можно сказать, что одним из путей фармакологической регуляции функциональной активности Н-холинергических систем может быть не только процесс узнавания Н-холинергических агонистов, но и последующие этапы сопряжения Н-холинорецепторов с эффекторной системой, регулирующей транспорт Na^+ и Ca^{2+} через мембраны.

Важно отметить, что некоторые классические Н-холиноблокаторы (например, декаметоний, d-тубокурарин) обладают также свойствами агонистов, являясь по существу частичными агонистами в отношении Н-холинорецепторов скелетных мышц. Оказалось, что некоторые курареподобные вещества не только конкурентно блокируют действие ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе, но и сами способны вызывать деполяризацию мышечных волокон крыс. При увеличении концентрации тубокурарина частота открытия натриевых каналов в этих волокнах уменьшалась, а при увеличении концентрации ацетилхолина она повышалась.

По характеру влияния на нервно-мышечную передачу различные лекарственные вещества можно классифицировать следующим образом.

1. ЛВ, блокирующие открытый канал Н-холинорецепторов. К этой группе относятся местноанестезирующие препараты, барбитураты, атропин, преднизолон, амантадин, хинакрин, этидия бромид.

Большинство из этих веществ имеют более сильное сродство к ионным каналам этого рецептора в открытом состоянии, чем в закрытом.

2. ЛВ, конкурирующие с ацетилхолином за связывание с Н-холинорецепторами. К таким веществам относятся классические конкурентные антагонисты тубокурарин и галламин. Они имеют высокое сродство не только к участкам, узнающим ацетилхолин, но и к ионным каналам в открытом состоянии.

3. ЛВ, вызывающие последовательно открытие и блокирование ионных каналов Н-холинорецепторов. Примером таких веществ может служить декаметоний.

4. ЛВ, влияющие на липидное окружение Н-холинорецепторов и тем самым изменяющие свойства их ионных каналов. Возможно, что таким образом действуют наркотические средства и алкоголь.

5. ЛВ, влияющие на десенситизацию Н-холинорецепторов — процесс, сопровождающийся закрытием ионных каналов. Как уже указывалось, веществом, ингибирующим десенситизацию, является 4-аминопиридин.

Проблема, связанная с выяснением механизмов регуляции количества Н-холинорецепторов и их способности взаимодействовать с лигандами, кроме теоретического, имеет и большое практическое значение.

После денервации скелетной мышцы лягушки наблюдается постепенное увеличение участков, связывающих α-бунгаротоксин. Через 2–3 недели оно превышает нормальный уровень в 10–20 раз. Кроме того, для Н-холинорецепторов имеется (свойственный им и инсулиновым рецепторам) другой путь изменения их числа. При аутоиммунном заболевании (например, миастения) развивается гуморальная и клеточная иммунная реакция против Н-холинорецепторов, что приводит к умень-

шению числа Н-холинорецепторов на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса и служит основной причиной нарушения нервно-мышечной передачи. У больных с этим заболеванием обнаружены антитела против Н-холинорецепторов, а введение животным IgG-антител, выделенных у данных больных, сопровождается возникновением симптомов миастении.

Установлено, что деградация Н-холинорецепторов в культуре мышечных клеток BC3 H в норме или вызываемая антителами не зависит от внеклеточного Ca^{2+} и уменьшается в присутствии бацитрацина, метиламина и хлорида аммония. Антитела против холинорецепторов увеличивали число эндоцитозных везикул в этих клетках, но не влияли на скорость синтеза холинорецепторов. Рецепторы для холиномиметиков, так же как и для β-адреномиметиков, инсулина, трийодтиронина и других физиологически активных веществ после связывания агонистов образуют кластеры в определённых участках плазмолеммы и затем подвергаются интернализации путём эндоцитоза. Образующиеся из везикул эндосомы сливаются с лизосомами, в которых происходит деградация рецепторов. Агонисты, снижающие число нейрональных рецепторов, связывающих α-бунгаротоксин, увеличивают деградацию Н-холинорецепторов.

Лизосомотропные вещества, ингибирующие функцию лизосом, уменьшают деградацию Н-холинорецепторов, но не их интернализацию.

Таким образом, можно сделать вывод, что антитела против Н-холинорецепторов нарушают функцию нервно-мышечного синапса вследствие увеличения скорости деградации этих рецепторов, опосредованную эндосомами и лизосомами.

По нашему мнению, такое своеобразное явление для Н-холинорецепторов, как возникновение аутоиммунных антител против них, может быть связано со значительным выступанием молекул Н-холинорецепторов из мембраны и с лёгкостью взаимодействия с ними не только специфических агонистов, но и других молекул, в частности белков и клеток иммунной системы.

3.2.2. М-холинорецепторы. Как известно, мускариновым агонистам свойственны такие эффекты, как сужение зрачка, сокращение неисчерченных мышц, иннервируемых парасимпатическими волокнами, стимуляция секреции слюнных и желудочных желёз, комплексное изменение функций сердечно-сосудистой системы и др. Однако в большинстве фармакологических исследований М-холинорецепторов определяли способность холинергических средств влиять на сокращение неисчерченных мышц (чаще всего подвздошной кишки) и на артериальное давление. Позднее с развитием техники микроионофореза и микроэлектродов появилась возможность изучать изменения мембранного потенциала при воздействии М-холинергических веществ. Ещё позднее было показано, что биологическим тестом функционирования М-холинорецепторов может служить опосредование ими образования цГМФ. Много ценной информации об М-холинорецепторах было получено с помощью радиолигандов. Известно, что наибольшая плотность М-холинорецепторов имеется в экстрапирамидной системе мозга и что различные вещества (Na^{5+}, гуаниновые нуклеотиды) по-разному влияют на связывание агонистов и антагонистов с мускариновыми рецепторами.

При изучении антимускариновой активности двух нейромышечных блокаторов стеркурония и галламина в отношении предсердия, подвздошной кишки и мочевого пузыря морских свинок было обнаружено, что оба антагониста имеют большее сродство к рецепторам сердца, чем к рецепторам подвздошной кишки и мочевого пузыря.

Изучение влияние четырёх антагонистов на деполяризацию изолированного верхнего шейного ганглия и на сокращение подвздошной кишки свидетельствует

о неидентичности М-холинорецепторов в этих тканях; стеркуроний и пирензепин имеют большое сродство к рецепторам ганглия, 4-дифенилацетоксин-N-метилпиперидин — к рецепторам подвздошной кишки, N-метилскополамин действовал на рецепторы этих тканей одинаково. Более того, если N-метилскополамин и атропин одинаково связывались с М-холинорецепторами гомогенатов головного мозга, желёз, сердца и неисчерченных мышц, то пирензепин — различно, что указывает на существование подклассов М-холинорецепторов.

Некоторые холиномиметики (3- и 4-ацетокси-N-метилпиперидинметиодид и метахолин) в отличие от ацетилтропина неодинаково влияют на сокращение мышц подвздошной кишки, силу и частоту сокращений мышц предсердия морской свинки. На этом основании они выделили M_1-рецепторы подвздошной кишки и M_2- и M_3-рецепторы предсердия.

В то же время необходимо отметить, что для агонистов нет такой корреляции, как для антагонистов в отношении их сродства к М-холинорецепторам, определяемой из кривых доза–эффект или с помощью изучения связывания радиолигандов.

Фармакологическим доказательством гетерогенности М-холинорецепторов является тот факт, что антагонист пирензепин имеет неодинаковое сродство к М-холинорецепторам различной локализации. Мускариновые рецепторы, имеющие высокое сродство к пирензепину, превалируют в различных областях головного мозга и периферических ганглиях млекопитающих, а рецепторы с низким сродством к пирензепину — в сердце, неисчерченных мышцах верхних отделов желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря. В ганглиях эти М-холинорецепторы опосредуют деполяризацию, а в подвздошной кишке и сердце — сокращение гладких мышц.

При изучении связывания L-^{3}H-хинуклидинилбензилата с М-холинорецепторами синаптосомальных мембран коры головного мозга кошек также выявлена гетерогенность этих рецепторов. Результаты по связыванию обрабатывали, используя различные модели: 1) модель для n гетерогенных участков ($n = 1$, 2 или 3) и 2) модель для двух кооперативных участков. Оказалось, что первая модель лучше описывает полученные результаты. Скэтчардовский анализ показал, что $K_{д1} = 5{,}2$ и $K_{д2} = 144$ пМ; $B_{max\,1} = 366$ и $B_{max\,2} = 558$ пмоль/м^2 белка. Конкуренция между хинуклидинилбензилатом и мускариновыми антагонистами атропином и скополамином за связывание с мембранами характеризовалась величинами $IC_{50} = 1{,}4$ и 3,4 мкМ соответственно и коэффициентом Хилла около 1, а конкуренция его с мускариновыми агонистами оксотреморином и карбамилхолином — величинами $IC_{50} = 0{,}9$ и 47 мкМ и коэффициентами Хилла 0,70 и 0,56 соответственно. Из кинетических экспериментов следовало, что процесс диссоциации хинуклидинилбензилата из его комплекса с М-холинорецепторами двухфазен: быстрая компонента имеет $K_{-2} = 37{,}7 \cdot 10^{-3}$ мин$^{-1}$, а медленная компонента $K_{-1} = 4{,}8 \cdot 10^{-3}$ мин$^{-1}$. Константы скорости ассоциации агониста с рецепторами составили: $K_{+1} = 4{,}9 \cdot 10^{-4}$ и $K_{+2} = 161 \cdot 10^{-4}$ пмоль$^{-1}$ мин$^{-1}$. Константы диссоциации, рассчитанные из этих кинетических данных, равнялись $K_{д1} = 9{,}7$ пМ и $K_{д2} = 342$ пМ, что не сильно отличается от результатов, полученных с помощью равновесного диализа. Таким образом, данная работа свидетельствует о наличии двух независимых участков связывания хинуклидинил-бензилата в синаптосомальных мембранах коры мозга кошек.

О гетерогенности М-холинорецепторов головного мозга крыс свидетельствуют также данные, согласно которым 4-метилпиперидилбензилат в широком диапазоне доз вызывает двигательную гиперактивность, не оказывая влияния на выработку условного рефлекса пассивного избегания, а тропиновый эфир фенциклопентилгликолевой кислоты воздействует на память и двигательную активность в одинаковых дозах [1]. Скополамин при сопоставлении доз, вызывающих тот и другой эффекты, занимает промежуточное положение.

Агонисты и антагонисты не во всех случаях конкурируют за одни и те же участки узнавания М-холинорецепторов. Так, показано, что никотиновый антагонист галламин ингибирует М-холинорецепторы сердца не по конкурентному механизму. Возможно, что галламин взаимодействует с участками, отличными от связывания ацетилхолина и классических мускариновых антагонистов.

О гетерогенности М-холинорецепторов свидетельствуют также данные, полученные в лаборатории Д. А. Харкевича. Обнаружено, что бисчетвертичные аммониевые соли труксиллиновой кислоты обладают выраженной избирательностью по отношению к М-холинорецепторам сердца; у кошек производные α-труксиллиновой кислоты анатруксоний и циклобутоний в малых дозах эффективно блокировали М-холинорецепторы сердца, но не М-холинорецепторы подвздошной кишки, мочевого пузыря, кровеносных сосудов и слюнных желёз. Их антимускариновое действие на бронхи было слабым. Избирательность анатруксония к М-холинорецепторам сердца была подтверждена в экспериментах с изолированными предсердиями и подвздошной кишки крыс. В то время как сродство атропина к этим препаратам было одинаковым, анатруксоний значительно сильнее действовал на предсердие, чем на подвздошную кишку. Избирательное блокирование М-холинорецепторов сердца было выявлено этими авторами также для некоторых бисчетвертичных аммониевых производных с адамантильными радикалами — диадония и декадония, обладающими гидрофобными заместителями, способными образовывать дополнительные связи с М-холинорецепторами. В то же время бисчетвертичные аммониевые соли алифатических дикарбоновых кислот и декаметоний, лишенные гидрофобных заместителей, не обладали антимускариновым кардиотропным эффектом.

Важно отметить, что изменение антимускариновой активности в ряду бисчетвертичных аммониевых производных α-труксиллиновой кислоты коррелирует с изменением их курареподобной активности. Однако этот факт не доказывает идентичность мускариновых рецепторов сердца с никотиновыми рецепторами концевой пластинки.

Для практической фармакологии важно, что выявленная гетерогенность М-холинорецепторов может позволить создать вещества, избирательно действующие на сердце и бронхи и не влияющие на экзокринные железы.

Ацетилхолин в концентрации 10^{-6}–$3 \cdot 10^{-4}$ М, но не оксотреморин и пилокарпин, вызывает сокращение отрезка изолированной артерии головного мозга кошек, а в концентрации 10^{-6} М ацетилхолин индуцирует её расширение. В обоих случаях атропин подавлял эффект ацетилхолина, а предварительная обработка артерии феноксибензамином (10^{-6} М) сопровождалась необратимым блокированием способности ацетилхолина индуцировать сокращение, но не дилатацию сосуда. При анализе М-холинорецепторов данного сосудистого препарата кошек с помощью ^{3}Н-хинуклидинилбензилата было выявлено, что специфическое с высоким сродством связывание радиолиганда ($K_д = 6 \cdot 10^{-10}$ М) ингибируется атропином и скополамином в наномолярных концентрациях. Из агонистов наиболее сильно снижал связывание этого лиганда оксотреморин (IC_{50} = 2 мкМ). Важно, что феноксибензамин (10 мкМ) также уменьшал связывание ^{3}Н-хинуклидинилбензилата с мембранами артерий кошек на 30%.

Таким образом, следует считать, что М-холинорецепторы сосудов млекопитающих гетерогенны и их можно дифференцировать с помощью феноксибензамина.

При изучении связывания (–)-^{3}Н-хинуклидинилбензилата с мускариновыми рецепторами мочевого пузыря и продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки были определены параметры связывания ($K_д = 2{,}6 \cdot 10^{-10}$ М в мочевом пузыре и $1{,}2 \cdot 10^{-9}$ М в подвздошной кишке), которые не подтвердили наличия гетерогенности М-холинорецепторов в данных биопрепаратах. Однако авторы не исключают

наличия этой гетерогенности в них, которую, по-видимому, можно будет определить с помощью антагониста пирензепина.

Применение методов клонирования генов, кодирующих М-холинорецепторы, подтвердило наличие их гетерогенности и позволило обнаружить 5 подтипов.

Все М-холинорецепторы сопряжены с G-белками, которые регулируют различные эффекторные системы. Стимуляция M_1- и M_3-холинорецепторов сопровождается активацией фосфолипазой С, гидролизом фосфоинозитидов и мобилизацией внутриклеточного кальция. В результате этого прямо или посредством фосфорилования белков-мишеней возникают кальцийзависимые биохимические эффекты. В то же время стимуляция M_2- и M_4-холинорецепторов приводит к ингибированию аденилатциклазы и изменению проницаемости ионных каналов (например, увеличению калиевой прово-димости в предсердии). Имеющиеся данные о М-холинорецепторах обобщены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Фармако-биохимические характеристики М-холинорецепторов

Рецептор	Антагонист	Ткань	Ответ	Молекулярный механизм
M_1	Атропин Пирензепин	Вегетативные ганглии	Деполяризация	Стимуляция фосфолипазы С, образования фосфоинозитидов и увеличение уровня внутриклеточного кальция
M_2	AF-DX 116	Сердце	Гиперполяризация, снижение сократимости	Активация калиевых каналов, ингибирование аденилатциклазы
M_3	Гексагидросиладифенидол	Гладкие мышцы, железы	Сокращение, увеличение секреции	Аналогично рецепторам M_2
M_4	Гимбацин	—	—	Аналогично рецепторам M_2
M_5	—	—	—	Аналогично рецепторам M_1

Таким образом, в настоящее время имеется немало работ, свидетельствующих о гетерогенности М-холинорецепторов. Однако для понимания её биологического значения необходимы дальнейшие исследования, направленные на выделение и идентификацию М-холинорецепторов и сопряжённых с ними эффекторных систем, особенно это касается рецепторов подтипа M_5. Многими исследователями показано, что стимуляция мускариновых рецепторов сопровождается увеличением уровня цГМФ в нервной ткани *in vivo* и *in vitro*. В связи с этим можно предполагать, что данный циклический нуклеотид принимает участие в реализации мускариноподобного эффекта ацетилхолина.

Из всех изучаемых систем наибольшее повышение уровня цГМФ в результате мускариновой стимуляции наблюдалось в культуре клеток нейробластомы мышей NIE-115 (до 200 раз). В этих клетках уровень цГМФ достигал максимума через 30 с и возвращался к исходному состоянию через 2–3 мин после воздействия агонистов. Повышение содержания цГМФ характеризовалось зависимостью от Ca^{2+} и температуры.

Об участии Ca^{2+} в индукции М-холиномиметиками образования цГМФ свидетельствуют следующие данные:

1. Внеклеточный Ca^{2+} необходим для реализации способности М-холиномиметиков повышать уровень цГМФ.

2. Блокаторы кальциевого канала (верапамил, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} и La^{3+}) подавляют увеличение синтеза цГМФ при стимуляции М-холинорецепторов.

3. Гуанилатциклаза нейробластомы мышей активируется Ca^{2+}.

4. При действии кальциевого ионофора в присутствии Ca^{2+} на интактные клетки наблюдается увеличение образования цГМФ.

5. Стимуляция М-холинорецепторов сопровождается увеличением входа Ca^{2+} в клетки.

Есть все основания считать, что по аналогии с H_1-гистаминергическими и α-адренергическими процессами сопряжение М-холинорецепторов с кальциевым каналом опосредовано фосфатидилинозитолом, метаболизм которого увеличивается при активации М-холинорецепторов. Увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке может приводить, во-первых, к активации гуанилатциклазы и синтезу цГМФ; во-вторых, к сокращению мышечных элементов; в-третьих, к фосфорилированию некоторых белков, включая и сам М-холинорецептор, что по механизму обратной связи вызовет снижение сродства агонистов к рецептору. Образующийся ГТФ со своей стороны также может быть модулятором связывающей способности М-холинорецепторов.

Рассматривая роль цГМФ, необходимо отметить также его способность влиять на активность фосфодиэстеразы и активировать цАМФ-зависимую протеинкиназу. В печени стимуляция холинорецепторов сопровождается увеличением содержания не только цГМФ, но и цАМФ. Дальнейшие исследования должны уточнить роль циклических нуклеотидов как вторичных посредников эффектов ацетилхолина и его агонистов. Однако, по нашему мнению, нужно также иметь ввиду, что ряд биохимических эффектов, связанных со стимуляцией М-холинорецепторов, может быть обусловлен продуктами обмена фосфатидилинозитола и Ca^{2+}.

Отметим, что ряд веществ, таких, например, как галоидалкиламины (феноксибензамин, дибенамин), могут изменять функционирование М-холинергической системы, связываясь в большей степени с сопряжёнными с рецепторами кальциевыми каналами, чем с самими М-холинорецепторам. При этом именно сродством галоидалкиламинов к кальциевым каналам можно объяснить их способность блокировать функцию других рецепторов (α-адренергических, H_1-гистаминовых, серотониновых, дофаминовых и опиоидных), также сопряжённых с кальциевыми каналами.

К факторам, влияющим на сопряжение М-холинорецепторов с кальциевыми каналами, относятся лантаноиды, которое имеют большее, чем Ca^{2+}, сродство к участкам, его связывающим.

Необходимо отметить, что имеются также данные о сопряжении М-холинорецепторов с аденилатциклазой. В сердце активация этих рецепторов сопровождается ингибированием активности аденилатциклазы. Гуаниновые нуклеотиды и Na^+ усиливают данный эффект холинергических агонистов. Предполагается, что в сопряжении М-холинорецепторов с аденилатциклазой принимает участие ГТФ/ГДФ-связывающий белок (G-белок).

Как и в случае других рецепторов, вслед за активацией М-холинорецепторов развивается их десенситизация, причём десенситизация к ацетилхолину может быть специфической и неспецифической. Неспецифическая десенситизация М-холинорецепторов развивается после инкубации подвздошной кишки морской свинки с высокими концентрациями ацетилхолина или гистамина (контрактильный ответ исчезал для любого агониста). В то же время десенситизация была специфической для рецепторов прямой кишки, которая после инкубации с гистамином теряла чувствительность к нему, но не к ацетилхолину.

При инкубации клеток нейробластомы мышей N1E-115 с мускариновыми агонистами в течение 30 мин происходит быстрая и специфическая потеря способности клеток отвечать повышением уровня цГМФ при стимуляции М-холинорецепторов, но

способность этих клеток связывать радиолиганды-агонисты не изменяется. Скорость развития этой десенситизации зависела от концентрации агониста и его эффективности, но не зависела от синтеза цГМФ и не выявлялась при температуре ниже 20 °С. После удаления агониста наблюдалось восстановление чувствительности (ресенситизация) с $t_{1/2}$, равным 13 мин. Скорость ресенситизации не зависела от концентрации или типа агониста, что указывает на её инициацию после диссоциации агониста от рецептора. Ресенситизация также характеризовалась зависимостью от температуры. Величины энергий активации десенситизации и ресенситизации (59 и 96 кДж/моль соответственно) свидетельствуют о конформационных изменениях рецепторного белка во время этих процессов. Поэтому можно считать, что быстро наступающая десенситизация обусловлена инактивацией кальциевых каналов, сопряжённых с М-холинорецепторами.

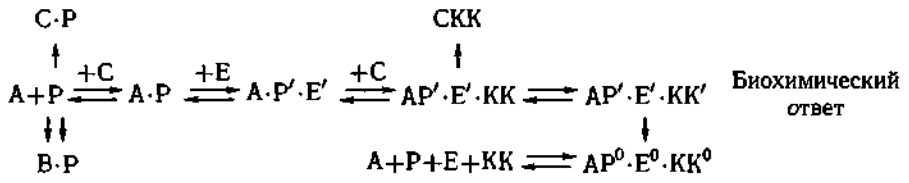
В отличие от короткодлящейся десенситизации в условиях длительной десенситизации, развивающейся при инкубации клеток с карбамилхолином (1 мМ) в течение более чем 1 ч, происходит снижение числа М-холинорецепторов и их сродства к радиолигандам-антагонистам. После удаления агонистов возвращение числа рецепторов к исходному уровню происходило быстрее ($t_{1/2} = 6$ ч), чем их функции ($t_{1/2} = 16$ ч).

Можно полагать, что снижение числа М-холинорецепторов при длительной стимуляции обусловлено их фосфорилированием, так как карбахол с одинаковой временной зависимостью индуцирует в нервной культуре клеток мозжечка крыс фосфорилирование трёх белков с $M_r = 75\,500$, 67 000 и 62 000 и уменьшение числа участков, связывающих ^{3}Н-хинуклидинилбензилат. В условиях фосфорилирования (присутствие в среде инкубации Mg^{2+} АТФ и цАМФ) происходит снижение связывания этого мускаринового антагониста с синаптосомальными мембранами клеток головного мозга крыс. Данное снижение числа М-холинорецепторов было кальмодулинзависимым и сопровождалось пропорциональным увеличением числа связывающих участков с ОВС по отношению к участкам с ВС.

По нашему мнению, фосфорилирование может быть одним из механизмов развития десенситизации и других типов рецепторов, поскольку в присутствии Mg^{2+}, АТФ или ГТФ наблюдается уменьшение способности вазопрессина, лютеинизирующего гормона, агонистов β-адренорецепторов и глюкагона специфически влиять на аденилатциклазу.

Таким образом, имеющиеся сведения позволяют предположить следующую схему функционирования М-холинорецепторов.

Агонист (А), взаимодействуя с интактным М-холинорецептором (Р), вызывает изменение его конформации (Р′), после чего у него появляется способность образовывать комплекс с эффектной системой (Е) (возможно, ферментом, катализирующим метаболизм фосфатидилинозитола). В результате активации этого фермента (Е′) происходит открытие кальциевого канала (КК), и он переходит в состояние повышенной проницаемости для Ca^{2+} (КК′). Если деградации агониста не происходит, то комплекс агонист–рецептор–эффектор не диссоциирует и он (комплекс) переходит в десенситизированное состояние $АРЕ^0$ $КК^0$). Кальций и лантаноиды в качестве аллостерических активаторов способствуют образованию этого комплекса. Антагонисты типа галоидалкиламинов (С) могут взаимодействовать как с рецептором, так и с кальциевым каналом, а чистые антагонисты типа атропина (В) обратимо взаимодействуют только с самим рецептором. Процесс ресенситизации включает в себя диссоциацию комплекса агониста с рецептором и циклическое возвращение системы в исходное состояние:



Анализ работ, посвящённых изучению изменения физико-химических свойств М-холинорецепторов при тех или иных воздействиях, свидетельствует о том, что существует три группы регуляторов: 1) модуляторы М-холинорецепторов, которые изменяют не число рецепторов, а их сродство к агонистам или антагонистам; 2) факторы, вызывающие изменения числа М-холинорецепторов, но не их сродства к радиолигандам; 3) факторы, индуцирующие изменения как сродства М-холинергических рецепторов к лигандам, так и их числа.

В предыдущих разделах мы уже касались возможности индукции гуаниновыми нуклеотидами, N-этилмалеимидом и катионами изменения способности М-холинорецепторов связывать радиолиганды. Однако имеются данные о том, что модуляторами М-холинорецепторов могут быть и другие вещества, в частности изопротеренол.

В большинстве этих исследований в качестве гуаниновых нуклеотидов применяли негидролизуемый нуклеотид ГФФ(NH)Ф. Другие пуриновые нуклеотиды в этом отношении были неактивны, что указывает на избирательность данного эффекта гуаниновых нуклеотидов. Отметим, что в действии гуаниновых нуклеотидов и Na^+ на М-холинорецепторы имеет место синергизм.

При сопоставлении действия Na^+ на М-холинергические, α-адренергические и опиатные рецепторы можно заметить, что Na^+ снижает сродство агонистов, увеличивает сродство антагонистов к мускариновым рецепторам, но действует противоположным образом на сродство агонистов и антагонистов к α-адренорецепторам и опиатным рецепторам.

Сравнивая способность различных одновалентных катионов влиять на связывание ^{3}H-хинуклидинилбензилата с М-холинорецепторами эмбриона сердца цыплят, V. V. Hossey (1983) обнаружил, что NH_4^+ сильнее, чем Na^+, регулирует связывающую способность этих рецепторов. Установлено, что NH_4^+ снижает сродство агонистов к М-холинорецепторам и является синергистом ГФФ[NH]Ф. Hossey обнаружил зависимость связывающей способности М-холинорецепторов от вида буфера. Оказалось, что ТРИС уменьшает сродство агонистов и антагонистов к этим рецепторам. Кроме того, это вещество конкурирует с моновалентными катионами в отношении ингибирования связывания антагонистов с М-холинорецепторами. Поэтому при изучении характеристик связывания лигандов с М-холинорецепторами (по-видимому, и с другими рецепторами) можно получить аномальные результаты (в ТРИС-HCl буфере и фосфатном буфере Na^+ противоположным образом влияет на сродство агонистов и антагонистов к М-холинорецепторам).

Отметим также, что в процессе онтогенеза число М-холинорецепторов в головном мозге и сердце млекопитающих, определяемое по связыванию ^{3}H-хинуклидинилбензилата, увеличивается от нуля до того уровня, которое имеет место во взрослом состоянии. Поскольку для холинергических веществ величины IC_{50} коррелируют с величинами ED_{50} для препаратов сердца животных разного возраста, нельзя сомневаться в том, что рецепторы, определяемые по связыванию этого радиолиганда, представляют собой физиологически активные М-холинорецепторы.

При гипертиреозе у крыс происходит уменьшение, а при гипотиреозе — увеличение общего числа М-холинорецепторов в сердце.

Однако оно не изменяется при гипертрофии сердца, вызванной почечной гипертензией, или при врождённой гипертрофии.

При внутрибрюшинном введении крысам амитриптилина (10 мг/кг) дважды в день в течение 30 сут происходит снижение количества М-холинорецепторов в коре головного мозга, которые связывают ^{3}Н-хинуклидинилбензилат, и уменьшение сродства М-холинорецепторов к этому лиганду.

При длительном введении крысам параоксона (увеличение действия агонистов на холинорецепторы) или скополамина (блокирование действия ацетилхолина на рецепторы) происходит уменьшение или увеличение, соответственно, чувствительности пресинаптических ауторецепторов, определяемой по способности экзогенного ацетилхолина (0,5 мкМ) ингибировать высвобождение ^{3}Н-ацетилхолина из синаптосом гиппокампа, но не чувствительности пресинаптических мускариновых гетерорецепторов, определяемой по потенцированию высвобождения ^{3}Н-дофамина из синаптосом полосатого тела.

Таким образом, следует отметить, что М-холинорецепторы представляют собой конформационно подвижные структуры, число которых регулируется специальными механизмами, специфичными для того или иного типа клеток. Низкомолекулярные модуляторы (гуаниновые нуклеотиды и катионы) индуцируют конформационные изменения в макромолекуле М-холинорецептора и тем самым изменяют его сродство к лигандам. Повышение или снижение числа молекулярных сигналов, получаемых клеткой посредством М-холинорецепторов по обратной связи, обусловливают уменьшение (интернализацию) или увеличение соответственно числа М-холинорецепторов на поверхности клеток.

3.3. Вещества, действующие в области М- и Н-холинорецепторов

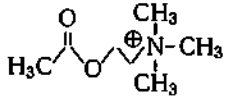
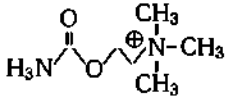
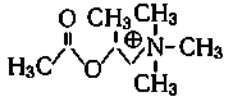
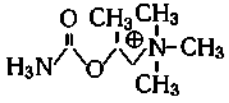
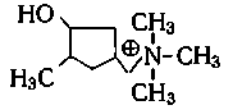
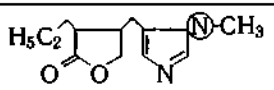
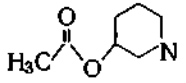
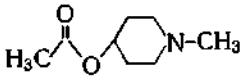
В эту группу фармакологических средств входят соединения, неизбирательно возбуждающие холинорецепторы, а именно ацетилхолин (АХ) и карбахолин (табл. 3.2), а также неселективный блокатор холинорецепторов циклодол.

При резорбтивном действии АХ вызывает изменение физиологических функций, аналогичное тому, которое происходит при возбуждении всех холинергических систем. Однако действие экзогенного (введённого извне) АХ не идентично действию АХ, образующегося в организме и принимающего участие в синаптической передаче возбуждения в ЦНС, вегетативных ганглиях, в холинергических синапсах на гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры и в экзокринных железах. При внутривенном введении АХ как соединение, содержащее четвертичный атом азота, плохо проникает в ЦНС, и поэтому его центральные эффекты слабо выражены. При системном действии АХ преобладают М-холиномиметические эффекты: брадикардия, расширение кровеносных сосудов, снижение АД, усиление перистальтики желудка и кишечника (возможно развитие колик и диареи); наблюдаются сокращение гладких мышц бронхов, матки, желчного и мочевого пузырей, усиление секреции пищеварительных, слёзных, бронхиальных и потовых желёз, сужение зрачка, спазм аккомодации и снижение внутриглазного давления.

Повышение активности симпатических ганглиев маскируется активацией парасимпатических, что можно выявить с помощью предварительного введения М-холиноблокаторов (например, атропина). На фоне атропина АХ повышает АД не только за счёт усиления передачи в симпатических ганглиях, но и вследствие активации хромаффинных клеток надпочечников, продуцирующих адреналин.

Таблица 3.2

Зависимость фармакологических свойств холиномиметиков от их химической структуры

Вещество	Химическая структура	Специфичность к рецепторам		Гидролиз холинэстеразой
		М-холинорецептор	Н-холинорецептор	
Ацетилхолин		+++	+++	+++
Карбахолин		++	+++	–
Мехолин		+++	+	+++
Бетанехол		+++	–	–
Мускарин		+++	–	–
Пилокарпин		++	–	–
Ацеклидин		+	–	+
Ареколин		++	–	+

АХ оказывает стимулирующее влияние на Н-холинорецепторы каротидных клубочков, вызывая рефлекторное возбуждение дыхательного центра. Эти эффекты АХ проявляются при введении его в дозе 0,1–0,5 мкг/кг массы тела. Большие дозы АХ (2–5 мкг/кг) вызывают блокаду М- и Н-холинорецепторов вследствие их десенситизации.

При внутривенном введении АХ действует до 15 мин, что обусловлено быстрым его разрушением эстеразами крови и тканей. В клинической практике может применяться карбахолин, у которого ацетильная группа заменена на карбамильную, что придаёт соединению устойчивость к действию гидролизующих ферментов. Применяют карбахолин при атониях кишечника, мочевого пузыря, иногда при глаукоме.

Циклодол, помимо периферического, оказывает и центральное холиноблокирующее действие, устраняя двигательные нарушения, связанные с поражением экстрапирамидной системы. Это ЛВ эффективно уменьшает тремор и в меньшей степени –

ригидность, что позволяет использовать его при паркинсонизме и других нарушениях функций экстрапирамидной системы. При длительном применении возможно привыкание к циклодолу.

АХ — наиболее сильный агонист как М-, так и Н-холинорецепторов. Особенности его химической структуры, определяющие фармакологические свойства, связаны с наличием четвертичного атома азота, несущего положительный заряд и определяющего свойства АХ как основания, и сложноэфирной группы, удалённой от атома азота на расстояние 3 Å и несущей частичный отрицательный заряд.

Соединения, имеющие четвертичную аммонийную группу, но не имеющие эфирной группы (холин), или вещества, в которых одна N-метильная группа заменена на атом водорода (третичные аммониевые соединения), обладают очень слабой холиномиметической активностью. Увеличение объёма четвертичной аммонийной группы введением бóльших радикалов, начиная с этильного, полностью лишает вещество холиномиметической активности. Изменение длины алифатической цепи, соединяющей атом азота и сложноэфирную группу, также значительно снижает его активность. Но, несмотря на уникальность холиномиметических свойств, АХ как лекарственное средство обладает двумя большими недостатками: 1) наличие эфирной связи делает АХ чувствительным к холинэстеразе, поэтому действие его весьма непродолжительно, и 2) сродство АХ к М- и Н-холинорецепторам не избирательно. Поэтому все попытки создания лекарственных веществ путём химическое модификации молекулы АХ были направлены на снижение его чувствительности к действию холинэстеразы и получению соединений, обладающих селективностью по отношению к холинорецепторам.

Замена ацетильной группы на карбамильную привела к получению карбахолина, активного по отношению к М- и Н-холинорецепторам, но значительно более устойчивого к гидролизу холинэстеразой. Присоединение метильной группы к β-углероду алифатической цепи приводит к образованию метахолина, избирательно активирующего М-холинорецепторы, но быстро гидролизующегося холинэстеразой. Комбинация этих двух модификаций позволила получить соединение бетанехол, которое избирательно стимулирует М-холинорецепторы и устойчиво к ферментативной деградации.

3.4. Фармакологическая регуляция активности М-холинорецепторов

М-холинорецепторы являются гликопротеиновыми мономерами с молекулярной массой около 80 кДа. Гликозилированный остаток рецептора составляет около 25% его массы и представлен сиаловыми кислотами, N-ацетилглюкозамином, сахарами: маннозой и галактозой. Рецептор устроен по типу рецепторов, функционирующих в составе комплекса с G-белком и ферментом-эффектором. Он встроен в мембрану таким образом, что его полипептидная цепь семь раз «прошивает» толщу мембраны (рис. 3.1, *а*), образуя по три петли над поверхностью клетки и внутри её. N-конец пептида находится снаружи, а С-конец — внутри клетки.

М-холинорецепторы неоднородны как по механизму развития ответа клетки при их стимуляции, так и по чувствительности к фармакологическим агентам.

Известны два механизма биохимического ответа клетки, опосредованного М-холинорецепторами. В одних тканях эффекторным ферментом является аденилатциклаза, и первичным ответом в этих тканях на действие лиганда миметика является ингибирование фермента с последующим снижением концентрации внутриклеточного цАМФ (рис. 3.1). В других тканях эффекторная часть рецепторного комплекса

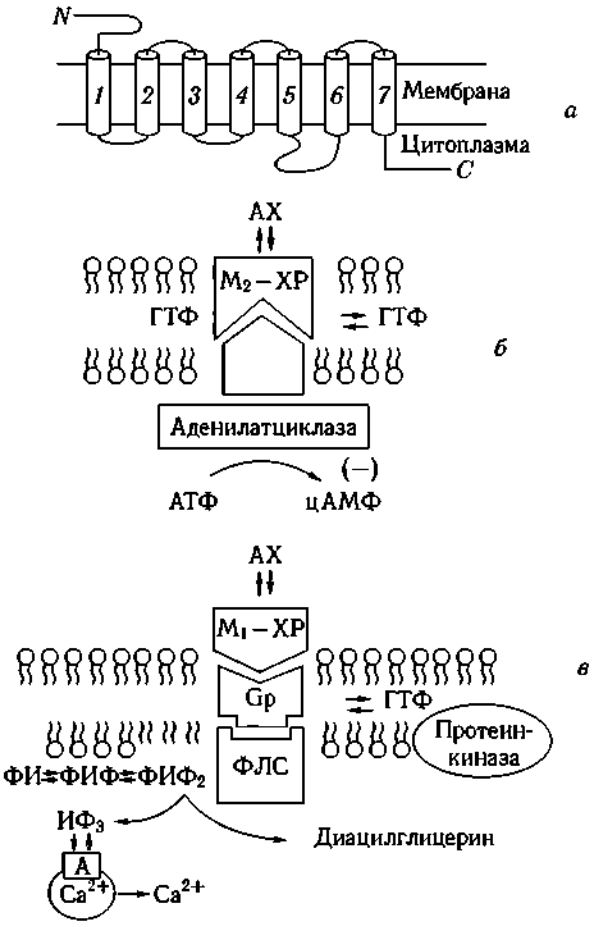


Рис. 3.1. Модель строения и функционирования М-холинорецепторов: *а* — схема строения М-холинорецепторов; *б* — модель функционирования M_2-, M_4- и M_5-холинорецепторов; *в* — модель функционирования M_1- и M_3-холинорецепторов

представлена фосфолипазой С, и первичным ответом этих тканей на действие АХ является активация фосфоинозитидного обмена, сопровождающаяся повышением концентрации диацилглицерина (ДАГ) и повышением концентрации в клетке свободных ионов Ca^{2+} за счёт его выхода из депо (рис. 3.1).

Гетерогенность М-холинорецепторов по биохимическим механизмам ответа компетентной клетки подтверждается их неодинаковым сродством к антагонистам. Наиболее полные сведения о гетерогенности М-холинорецепторов удалось получить при клонировании генов. Методом клонирования обнаружено пять типов М-холинорецепторов: M_1, M_2, M_3, M_4 и M_5. Четыре из них удалось идентифицировать функционально и фармакологически, из них наиболее хорошо изучены рецепторы M_1, M_2 и M_3.

M_1-рецепторы обнаруживаются в ЦНС (кора и гиппокамп) и на периферии: например, в париетальных клетках желудка, где посредством их стимулируется желудочная секреция.

Таблица 3.3

Подтипы М-холинорецепторов и их характеристики

Характеристики	M_1 (нейрональные)	M_2 (кардиальные)	M_3 (железы и гладкие мышцы)	M_4	M_5
Преимущественная локализация	ЦНС: кора, гиппокамп Железы: желудочные, слюнные и др.	Сердце: предсердие Гладкие мышцы: ЖКТ ЦНС	Экзокринные железы Гладкие мышцы: ЖКТ, глаз Сосуды: эндотелий	ЦНС: кора, полосатое тело	ЦНС: чёрное тело Слюнные железы Глаз: круговая и цилиарная мышцы
Клеточный ответ	Увеличение IP_3, ДАГ Возбуждение (медленный ПД), увеличение K^+-проводимости	Уменьшение цАМФ Ингибирование Уменьшение Ca^{2+}-проводимости Увеличение K^+-проводимости	Увеличение IP_3 Стимуляция Увеличение $[Ca^{2+}]$	Уменьшение цАМФ Ингибирование Уменьшение Ca^{2+}-проводимости Увеличение K^+-проводимости	Уменьшение цАМФ Ингибирование Уменьшение Ca^{2+}-проводимости Увеличение K^+-проводимости
Функциональный ответ	Возбуждение ЦНС Желудочная секреция	Брадикардия Ингибирование нейронов Центральные эффекты мускарина	Увеличение секреции слюнных желёз Увеличение тонуса и секреции ЖКТ Спазм аккомодации Вазодилатация	Увеличение локомоторной функции	Не известно
Агонисты (селективные выделены курсивом)	АХ Карбахолин Оксотреморин *McNA343*	Как и M_1	Как и M_1	Как и M_1	Как и M_1
Антагонисты (селективные выделены курсивом)	Атропин Дицикловерин Толтеродин Оксибутинин Ипратропиум *Пирензепин* *Токсин мамбы*	Атропин Дицикловерин Толтеродин Оксибутинин Ипратропиум *Галламин*	Атропин Дицикловерин Толтеродин Оксибутинин Ипратропиум	Атропин Дицикловерин Толтеродин Оксибутинин Ипратропиум *Токсин мамбы*	Атропин Дицикловерин Толтеродин Оксибутинин Ипратропиум

M_2-рецепторы располагаются в предсердиях, они ответственны за развитие брадикардии при стимуляции вагуса. Помимо этого M_2-рецепторы могут располагаться в центральных и периферических синапсах на пресинаптической мембране, их активация приводит к снижению выделения АХ из нервного окончания. Эффекты активации пре- и постсинаптических M_2-рецепторов обусловлены повышением активности K^+-каналов и ингибированием Ca^{2+}-каналов.

M_3-холинорецепторы при действии агонистов стимулируют секрецию экзокринных желёз и сокращение гладких мышц внутренних органов. Неиннервируемые M_3-рецепторы располагаются в эндотелии сосудов, при их стимуляции в клетках эндотелия образуется оксид азота, который, диффундируя в гладкомышечные клетки стенки сосуда, вызывает их релаксацию.

Основные характеристики подтипов М-холинорецепторов приведены в табл. 3.3.

В условиях постоянной длительной стимуляции М-холинорецепторов агонистами наблюдается явление их десенситизации, которое является одной из причин развития толерантности к этой группе лекарственных веществ. Считают, что десенситизация протекает в несколько стадий. Вначале происходит разобщение рецептора с G-белком и эффекторным ферментом без снижения числа рецепторов на поверхности клетки. Эта стадия инициируется цАМФ-независимым фосфорилированием рецептора. Затем наблюдается удаление, или секвестрация, рецепторов с клеточной поверхности в нервное окончание. После секвестрации содержащая рецептор везикула подвергается процессингу в аппарате Гольджи, откуда возвращается обратно и встраивается в плазматическую мембрану.

3.5. Фармакологические вещества, действующие в области М-холинорецепторов

Вещества, действующие в области М-холинорецепторов, в зависимости от характера влияния, делят на М-холиномиметики (парасимпатомиметики) и М-холиноблокаторы (парасимпатолитики). Фармакологические эффекты М-холинергических средств обусловлены особенностями функционирования М-холинорецепторов. Мускариновые рецепторы, в отличие от никотиновых, реагируют длительными и медленными ответами, продолжительность которых превосходит интервал между последовательными стимулами, осуществляя тем самым суммирование ответов во времени, что является исключительно важным для обеспечения равномерного управления функцией органа, например частотой сердечных сокращений.

3.5.1. М-холиномиметики (парасимпатомиметики). Препараты данной группы избирательно возбуждают М-холинорецепторы постсинаптических мембран, воспроизводя тем самым эффекты возбуждения парасимпатической нервной системы. Если сравнить структурные формулы М-холиномиметиков, то можно увидеть, что эти соединения схожи с АХ (табл. 3.2). Катионный азот в их молекулах находится на таком же расстоянии от карбонильного углерода, что обеспечивает парасимпатомиметикам взаимодействие с соответствующими центрами на М-холинорецепторе. Ответвления в углеродном мостике, вероятно, препятствуют этим соединениям взаимодействовать с Н-холинорецепторами, что придаёт избирательную чувствительность к М-холинорецепторам.

На первый взгляд, значительно меньшее сходство по химическому строению с АХ имеется у растительного алкалоида пилокарпина. Однако если собрать стерическую модель молекулы пилокарпина и вращать её имидазольный и лактоновый фрагменты вокруг метильного мостика, то можно приблизить катионный азот и аналог карбонильного углерода на расстояние, близкое к расстоянию между ними в молекуле АХ.

В группу М-холиномиметиков входят алкалоиды мускарин, пилокарпин и ареколин, а также синтетическое вещество ацеклидин. Все они содержат четвертичный (мускарин) или третичный (пилокарпин, ацеклидин, ареколин) атомы азота. Хотя при физиологических значениях pH третичные амины бывают в значительной степени ионизированы (хотя и в меньшей, чем четвертичные), они легче всасываются в ЖКТ и быстрее проникают через тканевые барьеры по сравнению с четвертичными.

Введение М-холиномиметиков (например, мускарина) воспроизводит эффекты возбуждения парасимпатической нервной системы (табл. 3.4): наблюдаются снижение частоты сердечных сокращений, снижение сердечного выброса, что обусловлено снижением силы сокращения предсердий (желудочки, в основном, иннервируются симпатической нервной системой и поэтому мало чувствительны к действию этой группы препаратов). Происходит генерализованное расширение сосудов. Этот мускариноподобный эффект не обусловлен холинергической иннервацией, он связан с переходом в активное состояние M_3-рецепторов эндотелия, что приводит к повышению в нём активности NO-синтетазы и, соответственно, образованию из L-аргинина оксида азота. Оксид азота, являясь мощным дилататором гладких мышц, диффундирует в мышечную стенку сосудов и вызывает их расширение, что в сочетании с уменьшением работы сердца приводит к снижению АД.

Таблица 3.4

Основные эффекты возбуждения парасимпатической нервной системы, опосредованные активацией М-холинорецепторов

Орган	Подтип рецепторов	Эффект
Сердце:		
синоатриальный узел	M_2	Уменьшение частоты возбуждения
предсердия	M_2	Уменьшение частоты сокращений
атриовентрикулярный узел	M_2	Уменьшение проводимости, атрио-вентрикулярный блок
Артериолы (эндотелий)	M_3	Образование NO, расширение
Внутренние органы:		
бронхи (гладкие мышцы)	M_3	Сокращение
экзокринные железы	M_3	Увеличение секреции
желудочно-кишечный тракт:	M_3	Сокращение
гладкие мышцы желудка	M_3	Расслабление
сфинктеры	M_3	Увеличение секреции
железы	M_1	Увеличение секреции соляной кислоты
Мужские половые органы	M_3 (?)	Эрекция
Глаз:		
зрачок (круговая мышца)	M_3	Сокращение
цилиарная мышца	M_3	Сокращение
Слюнные железы	M_3	Увеличение секреции
Слёзные железы	M_3	Увеличение секреции

Гладкие мышцы внутренних органов под действием мускарина сокращаются (за исключением гладких мышц сосудов), что приводит к бронхоконстрикции, повышению тонуса и усилению перистальтики ЖКТ. Повышается тонус мочевого пузыря.

Экзокринная секреция также усиливается под действием мускарина. Наблюдаются потливость, слезотечение, обильное слюноотделение; увеличивается секреция бронхиальных желёз. Сужение бронхов и усиление в них секреции может стать причиной затруднения дыхания.

Парасимпатическая активация разных отделов глаза выражается в повышении тонуса кольцевой мышцы радужной оболочки и сокращении цилиарной мышцы, которая регулирует положение цилиарного тела. Сокращение цилиарной мышцы в ответ на активацию M_3-ХР подтягивает цилиарное тело вперёд и вовнутрь, ослабляя натяжение цинновых связок, фиксирующих зрачок, что позволяет ему становиться более выпуклым. Происходит спазм аккомодации, и глаз настраивается на ближнюю точку ясного видения.

Сокращение круговой мышцы радужной оболочки важно не только для регуляции величины зрачка в зависимости от освещённости, но и для регуляции внутриглазного давления. Внутриглазная жидкость, продуцируемая эпителиальными клетками, покрывающими цилиарное тело, оттекает по шлемовым каналам, которые проходят вблизи наружной границы радужной оболочки. В норме внутриглазное давление на 10–15 мм рт. ст. превышает атмосферное, что помогает глазу сохранять выпуклую форму. Повышение внутриглазного давления может вызвать необратимые изменения в глазу: растяжение роговицы и отслоение сетчатки.

Иногда отток внутриглазной жидкости через шлемовы каналы затруднён при расширенном зрачке, так как складки радужной оболочки закрывают угол передней камеры глаза, где проходят шлемовы каналы. В таких случаях повышение тонуса круговой мышцы приводит к увеличению угла передней камеры глаза и улучшению оттока внутриглазной жидкости.

У здоровых людей внутриглазное давление меняется незначительно, при глаукоме оно снижается.

Пилокарпин является частичным агонистом М-холинорецепторов; он в большей степени стимулирует секрецию потовых, слёзных, слюнных и бронхиальных желёз. У ацеклидина более выражено активирующее влияние на тонус гладких мышц ЖКТ, моче- и желчевыводящих путей, мочевого пузыря. Ацеклидин обладает сильным миотическим действием.

Ареколин используется в экспериментальной фармакологии для изучения центральных М-холинергических синапсов. М-холиномиметики, способные проникать через гематоэнцефалический барьер, обладают выраженными центральными эффектами, обусловленными взаимодействием, главным образом, с M_1-холинорецепторами головного мозга. Они вызывают тремор, гипотермию, повышение локомоторной активности, положительно влияют на функцию узнавания.

3.5.2. М-холиноблокаторы (парасимпатолитики). К этой группе препаратов относятся алкалоиды растений семейства пасленовых (красавка, дурман, белена) — атропин, гиосцин (скополамин), платифиллин, созданные на основе атропина гоматропин и атропина метанитрат, а также синтетические соединения — метоцин, ипратропиум, циклопентолат, тропикамид, пирензепин.

Большинство М-холиноблокирующих средств, поскольку они содержат третичный атом азота, ионизированы при физиологических значениях pH, но они достаточно жирорастворимы для того, чтобы хорошо всасываться в ЖКТ или из конъюнктивального мешка и проникать через ГЭБ. У некоторых синтетических соединений,

например метоцина, катионная головка представлена четвертичным атомом азота, что определяет его преимущественно периферическое действие.

Все М-холиноблокаторы обладают приблизительно схожим спектром фармакологических свойств, которые можно рассмотреть на примере атропина. При введении атропина вначале наблюдается брадикардия, которая развивается вследствие его возбуждающего действия на центр *n. vagus*. Однако большие дозы атропина вызывают небольшую тахикардию (до 90 ударов в минуту) вследствие блокады M_2-холинорецепторов предсердия. Слабая выраженность эффекта обусловлена тем, что атропин блокирует лишь парасимпатическую систему, но не возбуждает симпатическую. Действие физических нагрузок на частоту сердечных сокращений на фоне атропина не изменяется. При введении атропина АД не меняется, так как большинство кровеносных сосудов не имеет холинергической иннервации.

Атропин ингибирует секрецию слюнных, слёзных, бронхиальных и потовых желёз, вызывая неприятное ощущение сухости во рту и сухость кожных покровов. В небольшой степени угнетает секрецию желудка. Угнетается и перистальтика ЖКТ, хотя для этого требуются несколько большие дозы препарата. Угнетение перистальтики и секреции не бывает полным, так как эти функции контролируются не только холинергическими механизмами, но и другими регуляторами, например серотонином, гистамином, простагландинами. Более отчётливо эффект атропина проявляется при повышенной перистальтике либо при спазме кишечника (кишечной колике).

Атропин снижает тонус гладких мышц бронхов, желче- и мочевыводящих путей. Предотвращает бронхоконстрикцию при анестезии, но не снимает бронхоспазма, вызванного гистамином (например, при астмоидном приступе).

Вследствие дилатации круговой мышцы радужной оболочки глаза наблюдаются расширение зрачка (мидриаз) и отсутствие зрачкового рефлекса на свет. Расслабление цилиарной мышцы приводит к параличу аккомодации (циклоплегии) и установлению глаза на дальнюю точку ясного видения. Внутриглазное давление может возрасти, что мало отражается на состоянии глаза у здорового человека, но может быть опасным для лиц, страдающих глаукомой.

Являясь третичными аммониевыми соединениями, М-холиноблокаторы проникают через ГЭБ и оказывают центральное действие. Они угнетают подкорковые двигательные центры, обладают седативным и противорвотным действием. Однако у атропина в ЦНС выражены свойства частичного агониста М-холинорецепторов, что проявляется в возбуждении головного мозга. При действии токсических доз атропина, что возможно при случайном употреблении в пищу плодов красавки или белены, наблюдается картина острого психоза: психомоторное возбуждение, спутанность сознания, бред, галлюцинации. Нарушениям психики сопутствуют явления, обусловленные периферическим действием атропина (расширенные зрачки, сухость во рту, сухая горячая кожа).

Наблюдаемое при отравлении атропином психическое возбуждение блокируется нейролептиками (хлорпромазином), а периферические токсические эффекты — антихолинэстеразными средствами (неостигмином).

Атропин и другие М-холиноблокаторы влияют на активность экстрапирамидной системы, уменьшая тремор и ригидность у больных паркинсонизмом.

Гиосцин, в отличие от атропина, в малых дозах оказывает выраженный седативный эффект на ЦНС, однако в больших дозах его действие аналогично действию атропина. Препараты группы М-холиноблокаторов нашли широкое применение в лечебной практике. В кардиологии их используют для лечения синусовой брадикардии в постинфарктный период, в офтальмологической практике их применяют при исследовании глазного дна и лечении воспалительных заболеваний глаза.

В анестезиологии М-холиноблокаторы являются премедикаментозными средствами для предотвращения рефлекторного бронхоспазма, снижения бронхиальной секреции и, следовательно, риска развития послеоперационной пневмонии. Они предотвращают брадикардию, вызываемую некоторыми анестетиками и миорелаксантами, а также рефлекторную остановку сердца. Предпочтение в этом случае следует отдать гиосцину, вследствие его седативного действия на ЦНС.

М-холиноблокаторы используют в качестве спазмолитических средств при проведении эндоскопических исследований, ими часто пользуются как средствами скорой помощи при печёночных, кишечных и почечных коликах, их вводят в состав бронхолитических коктейлей, используют при лечении астмы.

Их применяют как антидоты при отравлении антихолинэстеразными средствами. Селективные M_1-холиноблокаторы могут быть использованы для снижения желудочной секреции при лечении язвенной болезни (теперь чаще используют блокаторы H_2-гистаминовых рецепторов и ингибиторы Na^+/H^+-обмена)

М-холиноблокаторы входят в состав таблеток от морской болезни.

3.6. Фармакологическая регуляция активности Н-холинорецепторов

Н-холинорецепторы широко распространены в организме человека, так как расположены во всех нервно-мышечных и многих межнейронных синапсах. В целом их локализацию можно определить следующим образом:

1) ЦНС,
2) скелетные мышцы,
3) вегетативные ганглии,
4) хромаффинные клетки мозгового слоя надпочечников.

Помимо этого, Н-холинорецепторы обнаружены в каротидном и аортальном клубочках.

Строение и механизм функционирования Н-холинорецептора изучены подробно, что стало возможным благодаря наличию удобных источников этого типа рецепторов и существованию специфических маркёров.

Объектом для выделения Н-холинорецепторов в чистом виде послужил электрический орган некоторых тропических рыб, поскольку этот орган является аналогом скелетной мышцы и плотность Н-холинорецепторов в нём чрезвычайно высока: она достигает 10000 на 1 мм^2, что соответствует 140 мг рецепторного белка на 1 кг ткани. В качестве маркёра для идентификации и препаративного получения Н-холинорецепторов стал α-бунгаротоксин, компонент яда змей семейства кобр. Этот нейротоксин, будучи одноцепочечным полипептидом с высоким содержанием дисульфидных связей, обладает высоким сродством и селективностью по отношению к рецептору. Наличие подобного маркёра позволило выделить и достаточно подробно охарактеризовать Н-холинорецепторы не только из электрических органов рыб, но и из скелетных мышц млекопитающих, позднее Н-холинорецепторы были выделены и из различных отделов нервной системы млекопитающих.

Н-холинорецептор представляет собой мембранный гликопротеид, имеющий субъединичную структуру. Рецептор из электрического органа *Torpedo*, как и рецептор скелетных мышц млекопитающих, является пентамером, состоящим из субъединиц α, β, γ, δ в соотношении 2 : 1 : 1 : 1 соответственно. Его молекулярная масса составляет величину, близкую к 290 кД. Определены значения молекулярной массы каждой субъединицы α — 50,1; β — 53,7; γ — 56,6; δ — 57,5 кД.

Соединённые воедино субъединицы образуют асимметричный трансмембранный комплекс (рецептор), выступающий на 55 Å с внешней и на 15 Å с цитоплазматической стороны мембраны, с общей длинной 110 Å. В плоскости, параллельной мембране, выступающая часть рецептора представляет собой розетку диаметром 80 Å. Диаметр внутренней части рецептора 15–25 Å (рис. 3.2).

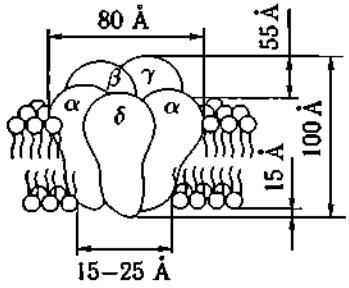


Рис. 3.2. Модель строения Н-холинорецептора

Анализ первичной структуры всех четырёх субъединиц Н-холинорецепторов электрического органа рыб и скелетных мышц млекопитающих показал высокую степень гомологии аминокислотной последовательности. Так, Н-холинорецепторы скелетных мышц человека по α-субъединице на 97% гомологичны рецепторам мышц крупного рогатого скота и на 80% — рецепторам электрического органа ската.

Опыты по реконструкции единого целого рецептора из субъединиц, выделенных из различных видов, показали, что такой рецептор способен функционировать. Исходя их этого, можно предположить, что Н-холинорецепторы возникли на ранних этапах филогенеза и структура их высоко консервативна.

Углеводная часть Н-холинорецептора включает в себя сахара маннозу, галактозу, D-глюкозу в соотношении 8 : 2 : 1 и N-ацетилглюкозамин. Гликозилирование принимает участие в формировании связывающих участков рецептора. Лишение α-субъединиц углеводной части приводит к изменению параметров связывания α-бунгаротоксина.

Все субъединицы рецептора имеют ориентацию, перпендикулярную плоскости мембраны. Каждая из субъедениц прошивает мембрану 4 раза, при этом полипептидные участки, находящиеся в мембране, находятся в виде α-спиралей (M_1, M_2, M_3, M_4), которые составляют 34% субъединиц. α-Спирали, группируясь вокруг центра, формируют трансмембранный канал диаметром около 6,5 Å, проницаемый для ионов Na^+ и K^+. Отсюда следует, что ионный канал формируют как минимум 20 прошивающих мембрану α-спиральных фрагментов, которые окружают центральную пору. Одна из трансмембранных спиралей (M_2) каждой из пяти субъединиц непосредственно участвует в формировании внутренней стенки ионного канала. Эти участки выходят внутрь канала, закрывая его в неактивном состоянии, и изменяют положение при активации рецептора, что приводит к открытию канала.

Опыты, в которых вызывали точечный мутагенез (т.е. замену одного аминокислотного остатка в спирали M_2), показали, что канал из катион-селективного (т.е. с возбуждающим эффектом на мембрану) может стать анион-селективным (т.е. со стабилизирующим действием, например, как ГАМК- или глициновый рецептор). Мутации в других точках могут вовсе лишить канал способности активироваться.

Подводя итог, можно сказать, что Н-холинорецептор является типичным примером рецептора-канала, к каким относятся также рецепторы γ-аминомасляной кисло-

ты или глицина (их первичная структура высоко гомологична первичной структуре никотинового холинорецептора).

α-Субъединицы Н-холинорецептора являются локусами, связывающими как АХ, так и α-бунгаротоксин. Таким образом, один рецептор связывает две молекулы медиатора. Связывание АХ на α субъединицах происходит по двум центрам: анионному, вступающему в электростатическое взаимодействие с катионной головкой АХ, и эстерофильному, образующему диполь-дипольную и водородные связи с карбонильным углеродом. Связывающие участки расположены в области N-конца α-субъединиц на границе с соседними субъединицами γ и δ, и для нормального функционирования рецептора необходимы все пять субъединиц.

При взаимодействии АХ с Н-холинорецептором происходит активация канала, ионы Na^+ устремляются внутрь клетки, что приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и возбуждению эффекторной клетки (мышечной или нервной). Один импульс возбуждения соответствует открытию 8000 каналов. Взаимодействие АХ с рецептором длится около 0,1 мс, после чего медиатор диссоциирует с рецептора и гидролизуется АХЭ. Канал после этого функционирует ещё около 1 мс.

Активации канала предшествует фосфорилирование субъединиц β, γ и δ. В фосфорилировании субъединиц участвуют три фермента: цАМФ-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа С и тирозинкиназа. Возможно, что фосфорилирование является одним из регуляторных механизмов десенситизации рецептора, которая наступает после связывания медиатора и открытия канала.

3.7. Гетерогенность Н-холинорецепторов

Обнаружено, что Н-холинорецепторы гетерогенны, поскольку неодинаково реагируют на агонисты (никотин) и антагонисты (ганглиоблокаторы и курареподобные средства). По тесту чувствительности к фармакологическим веществам можно выделить мышечные рецепторы нейромышечных синапсов (локализованные в скелетных мышцах, они избирательно блокируются α-бунгаротоксином и курареподобными средствами) и ганглионарные (локализованные в вегетативных ганглиях, хромаффинных клетках надпочечников и в синокаротидной зоне, они возбуждаются малыми дозами никотина и блокируются ганглиоблокаторами).

Однако клонирование рецепторов выявило весьма большое их разнообразие. Согласно этому способу идентификации, рецепторы можно разделить на три группы: мышечные (расположены в скелетных мышцах), ганглионарные (располагаются в вегетативных ганглиях, хромаффинной ткани надпочечников и в каротидном и аортальном клубочках) и рецепторы ЦНС. Гетерогенность Н-холинорецепторов обусловлена как разнообразием композиционного состава субъединиц, так и наличием нескольких изоформ самих субъединиц. Обнаружено девять изоформ α- и четыре изоформы β-субъединиц (изоморфизм у γ- и δ-субъединиц не выявлен). Согласно новым данным мышечные рецепторы взрослого человека имеют тот же состав, что и Н-холинорецепторы электрического органа рыб и относятся к типу $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$. Пентамер рецептора может быть построен только из субъединиц α и β; так, основной тип ганглионарных рецепторов — это $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, в ЦНС даже обнаружены рецепторы состоящие только из α-субъединиц — $(\alpha 7)_5$.

В ЦНС Н-холинорецепторы располагаются в ядрах таламуса, частично в гипоталамусе и коре, они также имеются в гипоталамусе, гиппокампе, коре, в некоторых зонах моста и ствола продолговатого мозга. В ЦНС рецепторы могут быть локализованы на пресинаптической мембране, где они осуществляют гомотропную и гетеротропную модуляцию высвобождения нейромедиаторов. Кроме того, как и мышечные рецепторы на периферии, они могут находиться и вне синапса.

Характеристики подтипов Н-холинорецепторов приведены в табл. 3.5.

Таблица 3.5

Подтипы Н-холинорецепторов и их характеристики

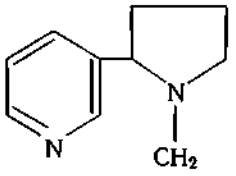
Подтип рецепторов	Мышечные $(\alpha 1)_2\beta\delta\varepsilon$	Ганглионарные $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$	ЦНС	
			$(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$	$(\alpha 7)_5$
Локализация	Нервномышечные синапсы (постсинаптические)	Автономные ганглии (постсинаптические)	Широко распространены (пре- и постсинаптические), ответственны за центральные эффекты никотина	Широко распространены (пре- и постсинаптические)
Ответ	Возбуждение, увеличение проницаемости для Na^+ и K^+	Возбуждение, увеличение проницаемости для Na^+ и K^+	Пре- и постсинаптическое возбуждение, увеличение проницаемости для Na^+ и K^+	Пре- и постсинаптическое возбуждение, увеличение проницаемости для Ca^{2+}; активация пресинаптических рецепторов приводит к увеличению выхода медиатора
Агонисты	АХ Карбахолин Суксаметоний (дитилин)	АХ Карбахолин Никотин Эпибатидин ДМПП	Никотин Эпибатидин АХ Цитизин	Эпибатидин ДМПП
Антагонисты	Тубокурарин Панкуроний Гексаметоний Атракурий Векуроний α-Бунгаротоксин α-Конотоксин	Мекамиламин Триметафан	Мекамиламин Метилаконитин α-Конотоксин	Метилаконитин α-Бунгаротоксин

3.8. Фармакологические вещества, действующие в области Н-холинорецепторов

Избирательная регуляция активности Н-холинергического синапса сводится к регуляции активности Н-холинорецепторов группой миметических средств (Н-холиномиметики) и блокаторов (ганглиоблокаторы и курареподобные средства).

3.8.1. Н-холиномиметики. Существует несколько природных алкалоидов, обладающих способностью возбуждать ганглионарные Н-холинорецепторы, т. е. рецепторы вегетативных ганглиев, хромаффинных клеток мозгового слоя надпочечников и аортального и каротидного клубочков. Природные Н-холиномиметики представлены никотином, лобелином, цитизином. Из синтетических Н-холиномиметических средств можно назвать тетраметиламмоний и диметилфенилпиперазин.

Хотя в терапевтических целях никотин не используется, в экспериментальной фармакологии он является эталоном при изучении Н-холиномиметической активности веществ. Кроме того, знание фармакологических свойств никотина важно в силу его высокой токсичности и наличия в табаке, к которому испытывает пристрастие большая часть населения:



Никотин — алкалоид, содержащийся в листьях табака. Это — имеющая щелочную реакцию бесцветная жидкость, которая на воздухе приобретает коричневую окраску и характерный запах табака. По химической структуре никотин является конденсатом пиридина и метилпирролидина. Его D- и L-изомеры обладают одинаковой активностью.

Фармакологическое действие никотина неоднозначно, поскольку помимо того, что он возбуждает симпатические и парасимпатические ганглии, никотин действует двухфазно: в малых дозах стимулирует, в больших — угнетает Н-холинорецепторы, вызывая их стойкую деполяризацию. Поэтому ответ каждого органа является суммой различных, а зачастую и противоположных, воздействий никотина на ту или иную функцию. Например, никотин может вызывать тахикардию вследствие стимуляции симпатических и угнетения парасимпатических ганглиев, равно как и брадикардию вследствие стимуляции парасимпатических и угнетения симпатических ганглиев. Воздействуя на рецепторы каротидного клубочка и центра продолговатого мозга, он урежает сердечный ритм и снижает АД, но в то же время, возбуждая Н-холинорецепторы хромаффинной ткани надпочечников, высвобождает адреналин в кровь, что ведёт к увеличению АД и тахикардии.

Периферические эффекты никотина обусловлены, прежде всего, стимуляцией ганглиев и хромаффинной ткани мозгового слоя надпочечников. В вегетативных ганглиях наблюдается преходящая стимуляция, которая при увеличении дозы никотина сменяется их стойким угнетением. В хромаффинной ткани также наблюдается двухфазное действие никотина: малые дозы усиливают выброс адреналина из хромаффинных клеток, большие дозы блокируют ответ мозгового вещества на раздражение чревного нерва.

Действие никотина на сердечно-сосудистую систему обусловлено стимуляцией симпатической нервной системы и хромаффинных клеток, и проявляется оно в тахикардии (вначале, вследствие стимуляции парасимпатических ганглиев, возможна преходящая брадикардия), повышении систолического и диастолического АД. В крови увеличивается содержание адреналина и норадреналина. Возможно развитие желудочковых экстрасистол. Повышается сердечный выброс, усиливаются работа сердца, коронарный кровоток и потребление сердцем кислорода. При склерозированных сосудах сердца коронарный кровоток под воздействием никотина не увеличивается, что становится причиной ишемии миокарда при повышенной работе сердца. Вследствие активации адреналином гликолиза и липолиза, никотин повышает уровень глюкозы и жирных кислот в крови, а также повышает агрегацию тромбоцитов, увеличивая риск тромбообразования.

Действие никотина на ЖКТ определяется активацией парасимпатических ганглиев и проявляется в повышении его тонуса и моторики. Возможно развитие колик и диареи. Стимуляция парасимпатических ганглиев также проявляется в усилении

желудочной секреции, что является фактором, способствующим образованию язв, так как секреция бикарбонатов никотином угнетается. Усиливается бронхиальная секреция. Стимуляция вегетативных ганглиев сменяется их ингибированием при повышении дозы никотина.

Нервно-мышечная передача менее чувствительна к малым дозам никотина, однако при увеличении дозы также наблюдается двухфазность его действия: первоначальная стимуляция Н-холинорецепторов скелетных мышц сменяется их блокадой.

Никотин хорошо проникает через ГЭБ. В ЦНС никотин взаимодействует преимущественно с рецепторами типа $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, которые широко представлены в головном мозгу, главным образом в коре и гиппокампе. Считают, что эти рецепторы связаны с функцией узнавания. Рецепторы расположены как на пост-, так и на пресинаптической мембране, при активации их в обоих случаях возникает возбуждение.

В целом никотин возбуждает ЦНС, вызывая тремор у человека и лабораторных животных, при увеличении дозы никотина тремор может смениться судорогами. Наблюдается активация никотином дыхания вследствие непосредственной стимуляции центров продолговатого мозга и возбуждения рецепторов синокаротидной зоны. Однако при введении никотина в больших дозах стимуляция ЦНС быстро сменяется её угнетением, что чревато параличом дыхательного центра. Угнетение дыхательного центра в сочетании с параличом дыхательных мышц и является той причиной, по которой «капля никотина убивает лошадь».

Никотин обладает выраженным анальгезирующим действием, он также снижает продукцию АДГ и возбуждает рвотный центр триггерной зоны.

У животных никотин повышает обучаемость.

Никотин угнетает спинальные рефлексы, вызывая релаксацию скелетных мышц. Это вызвано стимуляцией никотином ингибиторных клеток Реншоу в передних рогах спинного мозга.

При многократном введении малых доз никотина по многим фармакологическим показателям развивается толерантность, обусловленная десенситизацией рецепторов, и зависимость. Десенситизация Н-холинорецепторов в ЦНС имеет характерную особенность: постоянное введение никотина приводит к увеличению количества рецепторов. Этот эффект, противоположный действию многих агонистов, может отражать адаптацию органа к десенситизации рецепторов. Вероятнее всего, действие никотина на ЦНС отражает некий баланс между десенситизацией рецепторов (угнетение синапса) и увеличением их количества (повышение активности синапса). Возможно, именно в силу этой особенности никотина у курящих реже развиваются патологии, связанные с нарушением Н-холинергической регуляции в ЦНС: болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

Тетраметиламмоний и диметилфенилпиперазин отличаются от никотина тем, что не вызывают деполяризующего блока Н-холиноецепторов.

3.9. Ганглиоблокаторы

В отличие от никотина, ганглиоблокаторы ингибируют передачу возбуждения в ганглиях без первоначальной деполяризации (возбуждения) ганглионарных клеток. Ганглиоблокаторы связываются с активными центрами на Н-холинорецепторах ганглионарного типа, чем делают мембрану не чувствительной к действию АХ. Следовательно, механизм действия ганглиоблокаторов можно определить как конкурентное ингибирование Н-холинорецепторов ганглиев, мозгового слоя надпочечников и синокаротидной зоны по недеполяризующему механизму.

По химическому строению ганглиоблокаторы делятся на четвертичные аммониевые соединения (гексаметоний, азаметоний, трепирий) и третичные амины (пахикарпин, пемпидин, триметафан).

Все указанные вещества обладают схожим спектром фармакологических свойств и различаются лишь длительностью действия (от 15 мин до 8 ч).

Физиологические изменения, наступающие после блокады вегетативных ганглиев, позволяют трактовать действие этих ЛС как фармакологическую «перерезку» симпатических и парасимпатических ганглиев. Такой генерализованный, неизбирательный эффект ограничивает применение ганглиоблокаторов.

Описание фармакологических свойств ганглиоблокаторов, на первый взгляд, представляется сложной задачей, поскольку одновременная блокада симпатических и парасимпатических ганглиев во многих случаях должна приводить к противоположным эффектам. Поэтому при прогнозировании их действия следует учитывать преимущественное влияние симпатической или парасимпатической системы на функции того либо иного органа, а также активность того или иного отдела вегетативной нервной системы на момент введения ЛС (табл. 3.6).

Таблица 3.6

Действие ганглиоблокаторов на исполнительные органы

Орган	Преимущественная иннервация (в состоянии покоя)	Действие ганглиоблокаторов
Артериолы	Симпатическая	Дилатация, повышение скорости кровотока, гипотензия
Вены	Симпатическая	Дилатация, венозный застой
Сердце	Парасимпатическая	Тахикардия, снижение сердечного выброса
Радужная оболочка	Парасимпатическая	Мидриаз
Цилиарная мышца	Парасимпатическая	Паралич аккомодации
ЖКТ	Парасимпатическая	Снижение тонуса и перистальтики
Мочевой пузырь	Парасимпатическая	Задержка мочи
Слюнные железы	Парасимпатическая	Снижение секреции (сухость во рту)
Потовые железы	Симпатическая	Снижение секреции (ангидроз)

При введении ганглиоблокаторов изменение частоты сердечных сокращений зависит от исходного тонуса *n. vagus*: как правило, возникает тахикардия, однако если ввести препараты этой группы на фоне присутствующей тахикардии, то может произойти снижение частоты сокращений сердца. Вследствие уменьшения венозного оттока сердечный выброс у лиц с неизменённой функцией сердца снижается. У лиц с сердечной недостаточностью блокада ганглиев часто приводит к увеличению сердечного выброса из-за снижения периферического сопротивления, уменьшения венозного оттока и давления в правом предсердии.

Введение ганглиоблокаторов на фоне гипертензии снижает сердечный выброс, ударный объём и работу левого желудочка. Вследствие блокады симпатических ганглиев АД снижается. У находящихся в горизонтальном положении людей с нормальными показателями АД снижение АД выражено слабо, однако при перемене

положения на вертикальное АД может резко снизиться (ортостатическая гипотензия). Ортостатическая гипотензия длится довольно долго, что осложняет применение ганглиоблокаторов в амбулаторной практике.

Несмотря на то, что общее сопротивление сосудистого русла после введения ганглиоблокаторов уменьшается, скорость кровотока и сопротивление сосудов в различных сосудистых областях бывают неодинаковыми. Расширяются сосуды глаза, кожи (особенно на конечностях, что приводит к повышению их температуры). В скелетных мышцах кровоток не меняется. Наблюдается снижение кровотока во внутренних органах и в мозгу. Вследствие уменьшения кровотока в почках снижается клубочковая фильтрация. Действие на коронарный кровоток у ганглиоблокаторов непостоянно.

Фармакологическая блокада ганглиев приводит к уменьшению секреции в желудке и поджелудочной железе; снижается потоотделение. Со стороны глаза наблюдаются неполный мидриаз и частичный паралич аккомодации.

Снижается сократительная способность мочевого пузыря, что ведёт к увеличению его объёма и увеличению количества остаточной мочи. У мужчин нарушаются эректильная и эйякуляторная функции

Ганглиоблокаторы длительной и средней продолжительности можно применять для лечения гипертонической и язвенной болезней, при облитерирующем эндартериите, отёке лёгких, артериальной эмболии. Чаще всего в настоящее время короткодействующие блокаторы ганглиев используют в качестве ЛС для создания управляемой гипотензии при операциях.

3.10. Кураreподобные средства (периферические миорелаксанты)

Такое название получила группа лекарственных средств, которые вследствие угнетения нервно-мышечной передачи, подобно яду кураре, вызывают паралич скелетных мышц.

Яд кураре представляет собой смесь алкалоидов, содержащихся в растениях семейств *Strychnos* и *Chondrodendron*. В своём составе эти алкалоиды имеют четвертичную или третичную аммонийную группу. Основным представителем алкалоидов, содержащихся в кураре, является D-тубокурарин. Начало клинического использования кураре датируется 1932 г., когда высокоочищенные фракции кураре применили для купирования столбнячных судорог и лечения спастических расстройств, позднее им пользовались как вспомогательным медикаментом при шоковой терапии психических расстройств.

Впервые кураре как средство, вызывающее мышечную релаксацию при проведении общего наркоза, было использовано Гриффитсом и Джонсоном в 1842 г. С той поры хирургия стала основной областью применения периферических миорелаксантов в медицинской практике. Позднее в клиническую практику ввели диметилированное производное тубокурарина, которое по миорелаксирующим свойствам превосходило предшественник в три раза.

По механизму образования нервно-мышечного блока периферические миорелаксанты можно разделить на 1) недеполяризующие средства (тубокурарин, атракурий, векуроний, мивакурий, панкуроний, пипекуроний, рокуроний, толпирезол, престонал) и 2) деполяризующие средства (суксаметоний, декаметоний).

Как правило, все недеполяризующие средства блокируют Н-холинорецепторы по конкурентному типу, т. е. связываются на рецепторах с теми же центрами, с которыми взаимодействуют молекулы АХ. Однако участки связывания престонала отлича-

ются от связывающих центров для АХ, поэтому это вещество следует рассматривать как неконкурентный ингибитор мышечных Н-холинорецепторов.

Механизм блокады Н-холинорецепторов курареподобными средствами в известной мере отражается на их фармакологических свойствах. У животных при введении тубокурарина развивается вялость, двигательная заторможенность. В первую очередь на миорелаксант реагируют мелкие, быстродвигающиеся мышцы пальцев, глаз, мимические мышцы. Затем расслабляются крупные мышцы конечностей, шеи, туловища. В последнюю очередь наступает блокада межрёберных мышц и диафрагмы, что может вызвать остановку дыхания, при этом возможно появление судорог, которые быстро сменяются полным параличом. Жизнь животному можно спасти, если провести искусственное дыхание, так как действие тубокурарина непродолжительное — около 20 мин. Восстановление двигательной активности мышц происходит в порядке, обратном развитию их паралича: первой начинает функционировать диафрагма, и со временем происходит полное восстановление двигательной активности всех мышц.

У человека при внутривенном введении 10–15 мг тубокурарина ощущается головокружение, в теле появляется ощущение тепла, развиваются вялость челюстных мышц, затруднение фокусировки глаз, дизартрия, закрываются веки, происходит расслабление мышц гортани, среднего уха, что приводит к дисфагии и снижению слышимости низких тонов. Затем расслабляются мышцы конечностей, туловища, дыхание становится всё более диафрагмальным. Скопление слюны в гортани может привести к удушью. При сохранении сознания и чувствительности становятся невозможными произвольные движения головой, туловищем, конечностями. Первыми восстанавливают двигательную активность мышцы лица и диафрагмы, затем ног, рук, плечевого пояса, туловища, глотки, кистей рук, ступней, гортани.

При введении деполяризующих миорелаксантов вначале возникает возбуждение мышц, особенно груди и туловища, которое затем сменяется их параличом. Со временем паралич распространяется на мышцы шеи, рук и ног, со стороны лицевых, мимических мышц, мышц языка, гортани и глотки наблюдается небольшая слабость, нарушения дыхания не происходит. Жизненная ёмкость лёгких снижается лишь на 25%, т. е. деполяризующие миорелаксанты вызывают релаксацию скелетных мышц в дозах, не влияющих на дыхательные мышцы. Сравнение свойств недеполяризующих и деполяризующих миорелаксантов приводится в табл. 3.7.

Однако избирательность по отношению к мышечным Н-холинорецепторам у курареподобных средств не абсолютная, некоторые из них проявляют активность в отношении рецепторов ганглионарного типа, хотя и различаются по способности блокировать вегетативные ганглии. Тубокурарин вызывает небольшую блокаду ганглиев и хромаффинных клеток мозгового слоя надпочечников, что может вызывать снижение АД. Аналогичным свойством обладают деполяризующие курареподобные средства. Суксаметоний избирательно блокирует сердечную ветвь *n. vagus*, что может стать причиной развития синусовой тахикардии, аритмии и повышения АД. Панкуроний и пипекуроний в дозах, применяемых в клинике, эффектом на ганглии практически не обладают.

Некоторые курареподобные средства (тубокурарин, декаметоний) способны спровоцировать высвобождение гистамина из тучных клеток, что становится причиной гипотензии, бронхоспазма, гиперсекреции бронхиальных и слюнных желез. Гистамин высвобождается вследствие дегрануляции тучных клеток, поэтому наряду с гистамином из них выходит и гепарин, что приводит к снижению свёртывания крови. Гистаминовысвобождающее действие курареподобных средств не связано с их Н-холиноблокирующими свойствами, а обусловлено тем, что представители этой группы являются основаниями.

Таблица 3.7

Сравнение фармакологических свойств недеполяризующих и деполяризующих миорелаксантов

Свойство	Миорелаксанты	
	недеполяризующие	деполяризующие
Чувствительность млекопитающих	Крысы > мыши > кролики > > кошки	Кошки > кролики > мыши > > крысы
Избирательность действия на мышцы	Дыхательные (красные) более чувствительны, чем мышцы конечностей (белые)	Дыхательные менее чувствительны, чем мышцы конечностей
Эффект тубокурарина, введённого заранее	Аддитивное	Антагонистическое
Действие суксаметония, введённого заранее	Нет эффекта или антагонист	Тахифилаксия, отсутствие кумуляции
Действие антихолинэстеразных средств на блокаду	Антагонистическое	Синергичное
Действие на моторную концевую пластинку	Повышение порога чувствительности к АХ	Преходящее возбуждение

Повышение уровня гистамина и блокада вегетативных ганглиев рассматриваются в качестве основной причины побочных эффектов кураreподобных средство. Однако снижение артериального давления при быстром введении этих препаратов может быть результатом релаксации мышц и как следствие ухудшения венозного оттока от них.

Более тяжёлые осложнения могут возникнуть при использовании деполяризующих миорелаксантов. Стойкая деполяризация мембраны мышечной клетки приводит к выходу K^+ из неё и, как следствие, повышению его концентрации в плазме. Это может иметь неблагоприятные последствия у больных с травмой, особенно при ожогах и ранениях, когда нарушена иннервация мышц. Денервация вызывает увеличение количества н-ХР в мышце (не только в области концевой пластинки), поэтому большие поверхности мембраны мышечного волокна становятся чувствительными к суксаметонию. Гиперкалиемия, в свою очередь, может вызвать желудочковые аритмии и даже остановку сердца.

Более того, если обычно действие суксаметония длится 5 мин (он быстро разрушается эстеразами крови), то у больных с дефицитом эстераз паралич мышц может существенно пролонгироваться. Причины дефицита этой группы ферментов различны: у новорождённых или больных с заболеваниями печени синтез эстераз недостаточно интенсивен, кроме того, их отсутствие может быть генетически детерминировано.

Введение суксаметония (иногда и других кураreподобных средств) может спровоцировать развитие злокачественной гипертермии, что также обусловлено наследственными факторами — мутацией Ca^{2+}-каналов саркоплазматического ретикулума. Выход Ca^{2+} из депо вызывает сильный мышечный спазм и повышение температуры. Смертность от такой гипертермии достигает 65%. В этих случаях необходимо введение дантролена, предотвращающего выход Ca^{2+} из депо и тем самым способствующего релаксации мышц.

Антагонистами недеполяризующих средств являются антихолин-эстеразные средства (неостигмин). Действие деполяризующих миорелаксантов можно остановить

или уменьшить введением свежей цитратной крови, содержащей псевдохолинэстеразу, которая ускоряет их гидролиз.

Курареподобные средства всасываются из ЖКТ плохо, поэтому их обычно вводят внутривенно. Применяют их для достижения мышечной релаксации в анестезиологии при проведении операций, при бронхо-, ларинго- и эзофагоскопии, при отравлении судорожными ядами, для купирования острых судорог при столбняке и эпилепсии, а также в диагностических целях для дифференцировки мышечного спазма и нарушения функций костно-суставного аппарата.

3.11. Фармакологическая регуляция инактивации ацетилхолина

Действие АХ в синапсе прекращается вследствие гидролиза медиатора при содействии холинэстеразы. Ингибиторы этого фермента, антихолинэстеразные средства, являются холиномиметиками непрямого действия, поскольку их фармакологические свойства определяются активацией холинергической передачи в синапсах вследствие снижения скорости метаболизма АХ.

Известны два типа холинэстеразы АХ. Один из них — ацетилхолинэстераза (АХЭ), или истинная холинэстераза. Этот фермент локализован исключительно в области холинергических синапсов: на постсинаптической мембране, где он принимает участие в гидролизе высвободившегося АХ, и в терминалях холинергических волокон, где он расщепляет свободный, не связавшийся везикулами медиатор. Истинная холинэстераза обладает высокой специфичностью к АХ, гидролизует также метахолин.

Второй тип фермента — ложная холинэстераза (псевдохолинэстераза, или бутирилхолинэстераза). Это целое семейство ферментов, широко распространённых в организме и не имеющих топографической связи с холинергическим синапсом. Псевдохолинэстеразы обнаруживаются в плазме крови, в печени, коже, гладких мышцах. Фермент не связан с мембранами и находится в растворённом состоянии. Псевдохолинэстеразы не имеют субстратной специфичности к АХ, они гидролизуют сложные эфиры, в частности бутирилхолин, а также ЛВ, имеющие в структуре молекул сложноэфирные фрагменты.

3.12. Локализация, строение и функционирование ацетилхолинэстеразы

Согласно данным электронно-микроскопического, цитохимического и биохимических исследований, истинная холинэстераза локализована в области концевых пластинок холинергического нейрона. На постсинаптической мембране количество активных центров холинэстеразы примерно равно количеству связывающих центров на холинорецепторах и составляет величину 10^7 центров. АХЭ — это белок с молекулярной массой 80 кД, способный образовывать агрегаты *in vivo* и *in vitro*. На постсинаптической мембране скелетных мышц он обычно обнаруживается в виде тетрамера, хотя иногда наблюдаются более крупные агрегаты. Каждый мономер обладает ферментативной активностью.

Фермент имеет на своей поверхности два активных центра: анионный и эстеразный. Анионный центр представлен отрицательно заряженным остатком глутаминовой кислоты, по этому центру происходит электростатическое взаимодействие катионной головки АХ, которое усиливается гидрофобным взаимодействие N-метильных групп и дисперсионными силами Ван-дер-Ваальса (рис. 3.3)

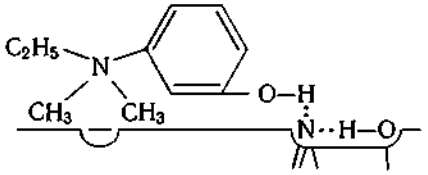


Рис. 3.3. Взаимодействие эдрофония с ацетилхолинэстеразой

Эстеразный центр состоит из двух участков; имидазольного кольца гистидина и потенциально кислой группировки — гидроксила серина, отстоящих от анионного центра на 2,5 и 5 Å соответственно. Имидазольная группа усиливает водородными связями нуклеофильную активность серина и способствует её взаимодействию с электрофильным атомом углерода карбонильной группы АХ. Между ними возникает ковалентная связь, при этом образуется ацетилированный фермент и освобождается холин (стадия 1).

Затем электрофильный атом углерода ацетогруппы подвергается нуклеофильной атаке отрицательно заряженного атома кислорода воды, что приводит к гидролизу ацетилированного фермента с образованием его исходной формы и освобождением уксусной кислоты (стадия 2). Константа скорости гидролиза АХ очень высокая, полный цикл обращения фермента занимает 80 мкс, которые приблизительно поровну распределяются на обе стадии реакции.

Активность холинэстеразы зависит от величины мембранного потенциала. Поскольку молекула АХ заряжена положительно, то увеличение плотности отрицательного заряда на поверхности мембраны будет увеличивать скорость инактивации АХ.

При взаимодействии АХ с Н-холинорецепторами происходит, как было сказано выше, обратимое фосфорилирование субъединиц β, γ и δ, что временно повышает плотность отрицательного заряда на постсинаптической мембране и, следовательно, активность АХЭ. Поэтому активация Н-холинорецепторов бывает весьма непродолжительной, что очень важно для возбудимых тканей: нервной и поперечнополосатых мышц.

3.13. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (антитилхолинэстеразные средства)

Используемые в фармакологии антихолинэстеразные средства по механизму их взаимодействия с ферментом можно разделить на три группы: ингибиторы анионного центра, ингибиторы эстеразного центра и ингибиторы обоих центров

К веществам, ингибирующим анионный центр, относят простые аммониевые четвертичные соли, вступающие в электростатическое взаимодействие с анионным центром фермента и конкурентно блокирующие доступ к нему катионной головки АХ. Более эффективные ингибиторы, в частности эдрофоний, могут взаимодействовать и с азотом имидазольной группы гистидина в эстеразном центре, образуя с ним водородные связи (рис. 3.3). Ингибирование фермента по одному катионному центру быстро обратимо, поэтому время действия таких препаратов короткое.

В отличие от них вещества, ингибирующие оба центра фермента, анионный и эстеразный, являются довольно сильными ингибиторами АХЭ — неостигмин, физостигмин, галантамин, пиридостигмин. Эти соединения также обратимо ингибируют фермент и при этом аналогично АХ гидролизуются в две стадии (рис. 3.4). В результате первой стадии образуется карбамоилированный фермент, гидролиз которого длится 30 мин, т. е. он в несколько миллионов раз медленнее, чем гидролиз

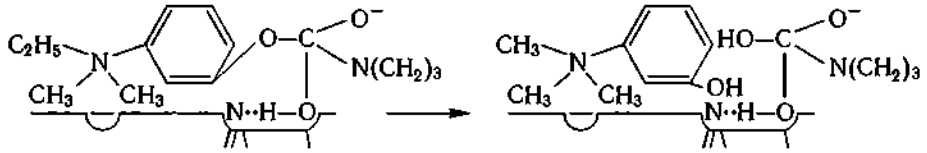


Рис. 3.4. Взаимодействие неостигмина с АХЭ

ацетилированной АХЭ. Поэтому соединения данной группы являются эффективными ингибиторами фермента.

К веществам, ингибирующим эстеразный центр, относятся фосфорорганические соединения (ФОС) — фосфакол, армин. Соединения этой группы были обнаружены при разработке химического оружия и пестицидов, они блокируют активный центр фермента путём ковалентного связывания с реакционноспособным остатком серина, в результате чего образуется фосфорилированный фермент. Гидролиз ковалентной связи и высвобождение исходной формы фермента занимают несколько часов, а некоторые фосфорорганические соединения, например диизопропилфторфосфат (ДПФФ), ингибируют эстеразный центр необратимо (рис. 3.5). В этом случае нормальное

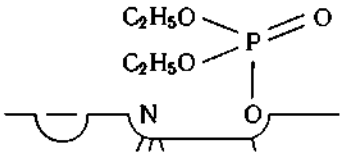


Рис. 3.5. Взаимодействие ДПФФ с АХЭ

функционирование фермента восстанавливается только после его синтеза *de novo*, что занимает около двух недель. Особая токсичность фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы обусловлена ещё и тем, что они ингибируют все ферменты, содержащие в активном центре серии: пищеварительные ферменты, большинство факторов свёртывания крови и др.

3.14. Зависимость фармакологических свойств ингибиторов ацетилхолинэстеразы от их химической структуры

В зависимости от количества заместителей у азота катионной головки антихолинэстеразные средства можно разделить на третичные и четвертичные аммониевые соединения. К третичным аминам относятся физостигимин, галантамин, к четвертичным — в частности, неостигмин, эдрофоний. Количество заместителей у атома азота существенно влияет на фармакологические свойства антихолинэстеразных средств.

Третичные амины и липофильные фосфорорганические соединения хорошо всасываются при приёме внутрь, легко проникают через ГЭБ. Поэтому в сравнении с четвертичными аммониевыми соединениями у них сильнее выражены центральные эффекты.

Четвертичные амины обладают прямым действием на Н-холинорецепторы, преимущественно скелетных мышц и в меньшей степени ганглиев. Вклад прямого действия этих соединений на Н-холинорецепторы зависит от особенностей конкретного средства, его дозы и вида животного. В зависимости от дозы прямой эффект может быть как миметическим, так и блокирующим. В малых и средних дозах четвертичные амины возбуждают Н-холинорецепторы, в высоких — блокируют их по деполяризующему механизму.

3.15. Фармакологические свойства антихолинэстеразных средств

Потенциально антихолинэстеразные средства должны обладать следующими свойствами: 1) мускариноподобной холиномиметической активностью; 2) никотиноподобной стимуляцией вегетативных ганглиев с последующим угнетением их вплоть до паралича; 3) способностью стимулировать сокращение скелетных мышц, сменяющееся блокадой нервно-мышечной проводимости, и 4) способностью стимулировать с последующим угнетением холинергические синапсы ЦНС. В действительности все типы эффектов наблюдаются только при введении животным токсических или даже летальных доз антихолинэстеразных средств.

При использовании малых, особенно терапевтических, доз проявление эффектов бывает частичным и зависит от особенностей применяемого средства. Основное клиническое применение антихолинэстеразных средств связано с их действием на функции глаза, ЖКТ, активность нервно-мышечного синапса и активность центральных синапсов.

Введение антихолинэстеразных средств вызывает миоз, спазм аккомодации и снижение внутриглазного давления. Отмеченные эффекты обусловлены сокращением сфинктера радужной оболочки глаза и повышением тонуса цилиарной мышцы. Со стороны ЖКТ наблюдается усиление перистальтики, которое особенно выражено в толстом кишечнике. Улучшение нервно-мышечной передачи отчётливо проявляется у неостигмина и других четвертичных аминов. Если в отсутствии антихолинэстеразных средств один нервный импульс вызывает одно сокращение, то при ингибировании холинэстеразы один импульс провоцирует несколько сокращений, при этом их сила и длительность увеличиваются. Избыточные количества АХ могут диффундировать к соседнему волокну, вызывая асинхронные сокращения мышцы (фибрилляцию). В больших дозах антихолинэстеразные средства вызывают блокаду мышц по деполяризующему механизму.

Ингибиторы холинэстеразы стимулируют секрецию экзокринных желёз, повышают тонус бронхов. Превалирующий эффект на сердечно-сосудистую систему — брадикардия и связанная с ней гипотензия.

Третичные амины и неполярные фосфорсодержащие соединения проникают через ГЭБ. Их центральное действие проявляется в возбуждении, которое по мере повышения дозы может смениться угнетением ЦНС, вплоть до потери сознания и угнетения дыхания.

При отравлении антихолинэстеразными средствами (преимущественно боевыми отравляющими веществами и инсектицидами) имеет место выраженная брадикардия, гипотензия, затруднение дыхания, паралич скелетных мышц, потеря сознания.

Центральные токсические эффекты ингибиторов холинэстеразы обусловлены нарушением М-холинергической передачи, поэтому они снимаются атропином. Поскольку гидролиз фосфорилированного фермента протекает медленно, желательно применение реактиваторов холинэстеразы, к которым относятся дипироксим, пальдом, изонитрозин — все они содержат оксимную группу (=N–OH), высоко реакционную в отношении остатков фосфорсодержащих соединений. Однако их введение бывает эффективным только вскоре после попадания ингибиторов АХЭ в организм, так как реактиваторы фермента не проникают через ГЭБ.

Антихолинэстеразные средства применяют для лечения глаукомы, при миастении, атонии кишечника, мочевого пузыря, при последствиях перенесённого полиомиелита, при дегенеративных процессах в ЦНС, в частности болезни Альцгеймера. Они также используются как антагонисты курареподобных недеполяризующих средств и при отравлениях алкалоидами красавки или белены [12].

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 3

1. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М.–Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.
2. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. — 384 с.
3. *Mufson E.J., Ginsberg S.D., Ikonomovic M.D., DeKosky S.T.* Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction // J. Chem. Neuroanat. 2003. V. 26, № 4. P. 233–242.
4. *Mufson E.J., Counts S.E., Fahnestock M., Ginsberg S.D.* Cholinotrophic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly // Curr. Alzheimer Res. 2007. V. 4, № 4. P. 340–350.
5. *Davis K.L., Mohs R.C., Marin D. et al.* Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease // JAMA. 1999. V. 281, № 15. P. 1401–1406.
6. *DeKosky S.T., Ikonomovic M.D., Styren S.D. et al.* Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment // Ann. Neurol. 2002. V. 51, № 2. P. 145–155.
7. *Saykin A.J., Wishart H.A., Rabin L.A. et al.* Cholinergic enhancement of frontal lobe activity in mild cognitive impairment // Brain. 2004. V. 127, Pt 7. P. 1574–1583.
8. *Bruno M.A., Clarke P.B., Seltzer A. et al.* Long-lasting rescue of age-associated deficits in cognition and the CNS cholinergic phenotype by a partial agonist peptidomimetic ligand of TrkA // J. Neurosci. 2004. V. 24, № 37. P. 8009–8018.
9. *Gotti C., Fornasari D., Clementi F.* Human neuronal nicotinic receptors. Prog. 8 // Neurobiol. 1997. V. 53, № 2. P. 199–237.
10. *Counts S.E., He B., Che S. et al.* $\alpha 7$ Nicotinic receptor up-regulation in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer's disease // Arch. Neurol. 2007. V. 64, № 12. P. 1771–1776.
11. *Caccamo A., Oddo S., Billings L.M. et al.* M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice // Neuron. 2006. V. 49, № 5. P. 671–682.
12. *Ballard C.G., Chalmers K.A., Todd C. et al.* Cholinesterase inhibitors reduce cortical Aβ in dementia with Lewy bodies // Neurology. 2007. V. 68, № 20. P. 1726–1729.

Глава 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

К адренергической системе относятся структуры, чувствительные к катехоламинам (КА) — адреналину (А) или норадреналину (НА), а также те нервные окончания, которые участвуют в обмене КА. Адренергическими лекарственными средствами называют вещества природного и синтетического происхождения, воспроизводящие или угнетающие полностью или частично в организме животных и человека эффекты эндогенных КА за счёт влияния на адренореактивные структуры — структурные элементы клетки, участвующие в обмене и транспорте эндогенных катехоламинов, а также адренорецепторы.

Молекулярная фармакология адренергических веществ определяется особенностями строения нервной системы и функционирования рецепторных систем, принимающих участие в процессах передачи нервных импульсов на эффекторные клетки [1].

Помимо симпатической нервной системы, адренергическая регуляция внутренних органов реализуется с участием структур, анатомически с ней не связанных, например внесинаптических (неиннервируемых) адренорецепторов, которые реагируют в основном на катехоламины, циркулирующие в кровеносном русле.

Если экзогенные адренергические вещества активируют адренергическую регуляцию внутренних органов, их называют адреномиметическими средствами (адреномиметиками), если же они её угнетают, то их называют адреноблокаторами или антиадренергическими средствами (веществами).

Адреномиметики (агонисты) воспроизводят, а антиадренергические вещества (антагонисты) блокируют в организме полностью или частично эффекты основных эндогенных катехоламинов организма — адреналина и норадреналина.

Международное непатенованное название адреналина — эпинефрин (от греческого *epi* — на, над; *nephros* — почка), а норадреналина — норэпинефрин.

По химическому строению катехоламины, адреналин и норадреналин являются аминами, у которых NH_2-группа через этильный радикал связана с пирокатехином (катехолом, ортодиоксибензолом), т. е. адреналин и норадреналин — это производные пирокатехинэтиламина.

По химическому строению адреналин и норадреналин близки друг к другу; оба вещества содержат в β-положении гидроксильную группу и отличаются лишь наличием дополнительной метильной группы у адреналина при атоме азота аминогруппы.

Основной мишенью действия адренергических веществ являются адренергические синапсы.

В случае адренергического синапса постсинаптическая мембрана обладает избирательной чувствительностью к химическому соединению — норадреналину и практически нечувствительна к электрическим раздражениям.

Избирательная чувствительность постсинаптической мембраны к определённым химическим веществам и медиаторам связана с наличием на её поверхности рецепторов — молекул, обладающих свойствами специфического взаимодействия с молекула-

ми медиатора. Рецепторы к медиатору, помимо постсинаптической мембраны, могут находиться и в отдалённых от синапса областях на поверхности мембраны.

Синапсы, в которых медиатором является НА, получили название адренергических (более точно, норадренергических) синапсов, а рецепторные структуры, реагирующие на норадреналин и адреналин, называют адренорецепторами.

Норадреналин — основной медиатор (нейромедиатор, нейротрансмиттер) адренергических синапсов синтезируется в области пресинаптической мембраны синапса в ходе многоступенчатого процесса из аминокислоты тирозина, получаемой либо из пищи, либо из незаменимой аминокислоты фенилаланина, которая в печени окисляется путём гидроксилирования в тирозин. Тирозин из печени с током крови приносится к нервным окончаниям, захватывается ими, и в аксоплазме начинаются пути превращения, приводящие к образованию из тирозина норадреналина и адреналина. Синтез катехоламинов является ферментативным процессом. Ферменты, принимающие участие в синтезе катехоламинов, синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме тела нервной клетки. С естественным током аксоплазмы они переносятся по аксону к нервному окончанию, где происходят все этапы синтеза катехоламинов, вплоть до образования норадреналина.

На стадии образования НА заканчивается процесс биосинтеза КА в симпатических нервных окончаниях. В хромаффинных клетках мозгового слоя надпочечника он продолжается до образования адреналина. Процесс превращения НА в А катализируется цитозольным ферментом фенилэтаноламин-N-метилтрансферазой, который помимо мозгового слоя надпочечников в небольших количествах может присутствовать в нервных окончаниях.

Норадреналин находится в симпатических нервных окончаниях в двух основных формах — свободной и связанной.

Свободный НА, не связанный с какими-либо структурами, состоит из вновь синтезированного в цитоплазме нервных клеток и обратно захваченного из синаптической щели. Его количество составляет 10–20% от всего НА, находящегося в нервных окончаниях.

Связанный НА включает прочно связанный НА, локализованный в крупных синаптических пузырьках (везикулах), и лабильно связанный, локализованный в малых синаптических пузырьках.

Связанный НА в синаптических пузырьках, как и свободный НА, состоит из вновь синтезированного и захваченного из аксоплазмы нервных клеток.

Синаптические пузырьки играют центральную роль в процессах образования, хранения и выброса медиатора в синаптическую щель.

В крупных синаптических пузырьках происходит заключительный этап биосинтеза НА. Малые синаптические пузырьки в основном накапливают НА и участвуют в его секреции в синаптическую щель.

Значительная разница в концентрации НА в синаптических пузырьках и окружающей аксоплазме говорит о том, что в синаптических пузырьках существуют специальные механизмы для поглощения НА. Предполагают, что существует 2 механизма поступления НА в малый синаптический пузырёк: пассивный, по градиенту концентрации, и активный, направленный против градиента концентрации, захват НА. Последний механизм захвата НА реализуется в присутствии АТФ с участием фермента H^+-АТФазы неспецифичным белковым переносчиком (переносит НА, дофамин, адреналин, серотонин).

Процесс высвобождения НА из нервных окончаний через пресинаптическую мембрану в синаптическую щель осуществляется не путём диффузии через пресинаптическую мембрану, а путём экзоцитоза, т.е. без предварительного выхода в цитоплазму нервной клетки.

Полагают, что увеличение содержания Ca^{2+} в адренергических окончаниях под влиянием нервного импульса индуцирует секрецию НА из синаптических пузырьков через пресинаптическую мембрану. Ca^{2+} поступает в нервную клетку из внеклеточной жидкости (его концентрация снаружи примерно в 10000 раз больше) после того, как нервный импульс вызывает деполяризацию нервного окончания. При этом уменьшается разность потенциалов на его мембране и открываются зависимые от разности потенциалов кальциевые каналы.

Поступивший в ходе деполяризации в нервное окончание Ca^{2+} вызывает высвобождение НА из синаптических пузырьков в синаптическую щель путём экзоцитоза.

После слияния синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной и выброса их содержимого в синаптическую щель участки пресинаптичекой мембраны, встроившиеся в неё в ходе экзоцитоза, подвергаются «вырезанию» и эндоцитозу, после чего пресинаптическая мембрана восстанавливает свои прежние размеры.

При этом поступившие обратно в аксоплазму синаптические пузырьки либо повторно используются, либо подвергаются в аппарате Гольджи частичной реконструкции или разрушаются в фаголизосомах.

Выделившийся под влиянием нервного импульса из нервного окончания норадреналин:

1) взаимодействует с пре- и постсинаптическими адренорецепторами в синаптической области и внесинаптическими адренорецепторами;

2) метаболизируется в постсинаптической клетке, в синаптической щели, а также после диффузии в кровоток в печени;

3) обратно захватывается нервными окончаниями с последующим повторным использованием и частичной ферментативной инактивацией; обратный захват присущ также различным ненейрональным тканям.

Суть обратного захвата заключается в уменьшении концентрации, выделившегося в ходе нервного импульса или экзогенно введённого медиатора норадреналина в синаптической щели за счёт его поглощения нейрональными или клеточными мембранами других тканей.

При этом полагают, что примерно 80% НА, провзаимодействовавшего с адренорецепторами, исчезает из синаптической щели за счёт механизма обратного захвата. Необходимость быстрого удаления НА из синаптической щели диктуется чисто регуляторными причинами. Медиатор должен исчезнуть из рецепторной области достаточно быстро, так как в противном случае его влияние было бы слишком продолжительным и точная регуляция была бы невозможной.

Процесс нейронального обратного захвата является Na^+-зависимым и действует с участием нескольких избирательных белковых переносчиков не только в отношении НА, но и адреналина, дофамина, серотонина и ряда близких по химическому строению синтетических и природных аналогов, например амфетамина.

Ферментативная инактивация КА осуществляется в основном за счёт двух ферментов — моноаминоксидазы (МАО) и катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), локализованных в различных органах, особенно в печени и почках. МАО и КОМТ разрушают около 10% выделившегося медиатора. В ЦНС ферментативное разрушение норадреналина и других катехоламинов в большей степени осуществляется МАО, чем КОМТ; в периферической нервной системе существуют обратные отношения.

МАО является мембраносвязанным ферментом, локализованным во внешних мембранах митохондрий, которые не проницаемы для аминов. Субстратом МАО тканей животных являются первичные, вторичные и третичные амины. Четвертичные амины МАО не окисляются. Различают изоферменты МАО типа А (МАО А) и МАО типа В (МАО В), отличающиеся чувствительностью к субстратам и ингибиторам. МАО А дезаминирует преимущественно норадреналин и серотонин и чувствительна

к ингибитору хлоргилину. МАО В дезаминирует фенилэтиламины и бензиламины и ингибируется дифенилом.

КОМТ является преимущественно растворимым цитозольным ферментом, кофактором КОМТ является Mg^{2+}. Существенной активности КОМТ во фракциях синаптических пузырьков, синаптических мембран и митохондрий не обнаружено. КОМТ является внутриклеточным ферментом и не локализуется на внешней стороне постсинаптической мембраны, но может проникать в синаптическую щель. Существуют противоречивые данные о наличии КОМТ в плазме крови. Функциональная роль КОМТ состоит в инактивации свободных катехоламинов в эффекторных клетках, особенно иннервируемых периферической нервной системой. Находящиеся в крови эндогенные и экзогенные катехоламины в основном инактивируются КОМТ печени. КОМТ катализирует О-метилирование катехоламинов. О-метилированные производные катехоламинов обладают в 100 раз меньшей биологической активностью, чем катехоламины.

Основным объектом воздействия выделившегося в синаптическую щель норадреналина являются адренергические рецепторы (адренорецепторы, АР).

4.1. Адренорецепторы

Ещё в 1905 г. J. N. Langley, используя рецепторную теорию Эрлиха, утверждал, что адреналин наряду с другими физиологически активными веществами оказывает воздействие в результате взаимодействия с «рецепторными субстанциями». Однако прошло более 40 лет, прежде чем учение об адренорецепторах получило молекулярно-биологическое подтверждение и дальнейшее развитие [1].

При исследовании соединений, предотвращающих сокращение миометрия, вызываемое вазопрессином, R. Ahlquist (1948) выявил неожиданные факты: сосудосуживающее соединение фенилэфрин расслабляет неисчерченные мышцы желудка, а метилнорадреналин, обладающий депрессорными свойствами, их не расслабляет; изопротеринол в большой дозе вызывает сокращение матки кролика; артеренол по сравнению с адреналином даёт меньший сосудосуживающий эффект.

Сравнивая фармакологические эффекты сходных по строению катехоламинов, R. Ahlquist пришёл к следующим выводам.

I. Существует два типа адренотропных (адренергических) рецепторов, определяемых по их чувствительности к родственным симпатомиметическим аминам. К первому типу относятся α-рецепторы. Они опосредуют в основном возбуждение функции (сужение сосудов, сокращение неисчерченных мышц матки, мочевого пузыря, зрачка) и в ряде случаев ингибирование функции (расслабление кишечника). Ко второму типу относятся β-рецепторы. Они опосредуют в основном снижение функции (расширение сосудов, релаксация неисчерченных мышц матки и бронхов) и в ряде случаев возбуждение функции (стимуляция миокарда).

II. Адреналин представляет собой биологически активный катехоламин по отношению как к α-, так и к β-адренорецепторам; адренорецепторы комплементарны молекуле адреналина.

Несомненной заслугой R. Ahlquist как исследователя является доказательство им гетерогенности адренорецепторов и попытка объяснения с помощью этого феномена противоположных по направленности эффектов катехоламинов при действии их на различные биологические объекты [2].

После R. Ahlquist некоторые авторы предложили другие гипотезы, объясняющие другие парадоксы адренорецепции. A. M. Lands (1952), изучив фармакологическую активность различных симптоматических аминов, выделил три вида адренорецепторов: Ас (возбуждающие), Аг (ингибирующие) и Агс (неидентифицирован-

ные). К неидентифицированным он отнёс адренорецепторы сердца и кишечника. R. F. Furchgott (1959) рассматривал ещё γ-адренорецепторы, опосредующие гликогенолитический эффект катехоламинов, и δ-адренорецепторы, опосредующие угнетение катехоламинами неисчерченных мышц кишечника. И всё же наиболее рациональной оказалась классификация адренорецепторов, предложенная R. Ahlquist. Она в настоящее время общепринята, хотя её продолжают дополнять и уточнять. В последующем оказалось целесообразным β-адренорецепторы разделить на два подкласса, β_1 и β_2, а затем три подкласса (было доказано существование β_3-адренорецепторов [2]. α-Адренорецепторы разделили на два подкласса, α_1 и α_2, а в последующем каждый из них ещё на три подтипа: α_{1A}, α_{1B}, α_{1D} и α_{2A}, α_{2B}, α_{2C} [2].

4.1.1. α-Адренорецепторы. Необходимость разделить α-адренорецепторы на два подкласса возникла после открытия и изучения свойств α-адренорецепторов на мембранах варикозных утолщений норадренергических нервных окончаний. Оказалось, что агонисты и антагонисты α-адренорецепторов по-разному влияют на пре- и постсинаптические рецепторы сердца и лёгочной артерии кроликов и селезёнки кошки. Отмеченная вариабельность α-адренорецепторов обусловила разделение на пресинаптические (α_2-рецепторы), опосредующие ингибирование функции, и постсинаптические (α_1-адренорецепторы), опосредующие возбуждение функции. Однако в дальнейшем α_2-адренорецепторы были найдены также на постсинаптических мембранах и несинаптических структурах. Поэтому α_1- и α_2-адренорецепторы следует разделить только по чувствительности к агонистам и антагонистам, а не по функции и локализации.

Наряду с классическим фармакологическим анализом прямые исследования характеристик α-адренорецепторов проводятся с помощью различных радиолигандов. ^{3}H-клонидин применяется для изучения взаимодействия фармакологических веществ с α_2-адренорецепторами. Для этой же цели можно использовать вещество СС 7525 А. α_1-Адренорецепторы идентифицируют с помощью ^{3}H-празозина. При необходимости одновременно пометить радиолигандом α_1- и α_2-рецепторы используют ^{3}H-дигидроэргокриптин.

α_1-Адренорецепторы. α_1-Адренорецепторы выявлены в разных типах неисчерченных мышц: в матке крыс (в ней присутствуют примерно одинаковые количества α_1- и α_2-адренорецепторов), в *vas deferens*, в желудке, в аорте, в артериях и венах, а также в мышце сердца.

При изучении параметров связывания ^{3}H-дигидроэргокриптина с культурой миоцитов линии ДДТ$_1$ MF-2 показано, что специфическое связывание этого лиганда насыщаемо и характеризуется $K_д$, равной $1{,}7 \pm 0{,}4$ нМ и числом связывающих участков, равным 197 ± 44 фмоль на 1 мг белка. Адреналин > норадреналин > изопротеренол вытесняли ^{3}H-дигидроэргокриптин из его связи с α-рецепторами. Математическое моделирование с помощью компьютера кривых конкуренции избирательного α_1-антагониста празосина и избирательного α_2-антагониста иохимбина с этим радиолигандом позволило установить, что более 95% α-адренорецепторов данных клеток относятся к α_1-подтипу.

В кишечнике α_1-адренорецепторы могут, вероятно, находиться не только на мембранах миоцитов, так как агонисты α-адренорецепторов: норадреналин > адреналин > клонидин > фенилэфрин > метоксамин стимулируют перенос жидкости через эпителий тощей кишки крыс. Этот перенос жидкости подавлялся антагонистами α-адренорецепторов: празозином > фентоламином > WB4101 > йохимбином > > раувольсцином. Видно, что α_1-адренергические вещества в этом отношении активнее α_2-адренергических веществ. Между физиологическими эффектами агонистов и антагонистов α-адренорецепторов и их влиянием на связывание ^{3}H-празозина

с мембранами наблюдалась корреляция. Поэтому можно считать, что α-адренорецепторы, принимающие участие в регуляции транспорта жидкости через эпителий тощей кишки крыс, представляют собой α_1-адренорецепторы.

α_1-Адренорецепторы в клетках бурого жира хомячков опосредуют способность фенилэфрина и норадреналина дозозависимым образом стимулировать включение ^{3}H-глицерина в фосфатидилинозитол и поглощение O_2 данными клетками. О функции, которую выполняют α_1-адренорецепторы ЦНС, пока имеется мало сведений.

Инфузия агонистов α_1-адренорецепторов D-амфетамина или фенилэфрина в субарахноидальное пространство поясничного отдела спинного мозга крыс приводит к увеличению величины рефлекса на акустическое возбуждение. Величина данного поведенческого эффекта указанных агонистов коррелировала с оккупацией α_1-адренорецепторов в ткани спинного мозга. Максимальное потенцирование фенилэфрином упомянутого рефлекса наблюдалось при оккупации 30% α_1-адренорецепторов. Результаты этого исследования позволили сделать следующие выводы: 1) α_1-адренорецепторы ЦНС принимают участие в регуляции поведения; 2) поведенческие эффекты ЛВ можно предсказывать на основании данных о связывающей способности соответствующих адренорецепторов, расположенных в ЦНС.

Адренорецепторы α_1 и α_2 являются неоднородными по физико-химическим характеристикам. Так, α_1-адренорецепторы плазматических мембран гепатоцитов крыс связывают адреналин с высоким и низким сродством. Связывание адреналина с α_1-адренорецепторами с высоким сродством характеризовалось $K_д$, равной 50 нМ, и B_{max}, равной 200 фмоль на 1 мг белка. Это связывание в большей степени ингибировалось празозином, чем иохимбином.

Плазматические мембраны гепатоцитов крыс содержат также α_2-адренорецепторы, которые связывают адреналин с высоким ($K_д = 1$ нМ) и низким ($K_д = 10$ нм) сродством. Из сопоставления величин $K_д$ взаимодействия адреналина с α_1- и α_2-адренорецепторами видно, что тип рецепторов, который в наибольшей степени вовлечён в ответ клетки на адреналин, зависит от концентрации последнего. Так, если для изучения связывания используется ^{3}H-адреналин в концентрации 10 нМ, то он преимущественно взаимодействует с α_2-адренорецепторами, а если используются физиологически эффективные концентрации адреналина (50–100 нМ), то он взаимодействует в основном с α_2-адренорецепторами.

Кроме описанного типа α_1-адренорецепторов известен также другой класс α_1-адренергических связывающих участков плазматических мембран клеток печени, которые имеют низкое сродство к адреналину ($K_д \sim 1$ мкМ), но высокое сродство к дигидроэргокриптину ($K_д \sim 5$ мкМ). Эти участки составляют примерно 80% от общего числа связывающих участков ^{3}H-дигидроэргокриптина с плазматическими мембранами клеток печени. Поскольку мягкая обработка трипсином плазматических мембран гепатоцитов переводит некоторое количество α_1-рецепторов с высоким сродством к дигидроэргокриптину в α_1-адренорецепторы с высоким сродством к адреналину, можно полагать, что первые представляют собой прорецепторы вторых. Вероятно, в организме могут возникать условия, при которых может наблюдаться «поломка» перехода прорецепторов в рецепторы или, наоборот, инициация данного процесса.

В 1990-е гг. с помощью метода гибридизации были надены мРНК, кодирующие синтез подтипов α_{1A}, α_{1B}, α_{1D} α-адреноредоцепторов, а с помощью гибридизации *in situ* определена их локализация в центральной нервной системе человека и крыс. Сродство радиолигандов к α_{1A}-адренорецепторам уменьшается в ряду: празозин = WB4101 > фентоламин > оксиметазолин > адреналин > норадреналин; к α_{1B}-адренорецепторам: празозин > WB4101 > фен-толамин > оксиметазолин > адреналин > норадреналин; к α_{1D}-адренорецепторам: празозин > WB4101 > норадреналин > фентоламин > адреналин > оксиметазолин.

α_2-Адренорецепторы. Иные функции, по сравнению с α_1-адренорецепторами, выполняют α_2-адренорецепторы.

Пресинаптические α_2-адренорецепторы, локализованные в норадренергических нервных окончаниях, опосредуют аутоингибирование высвобождения норадреналина как на периферии, так и в ЦНС.

Специфичность периферических пресинаптических α_2-адренорецепторов определяется при использовании в качестве тест-объекта изолированной лёгочной артерии кроликов. Клонидин, α-метилнорадреналин и трамазолин избирательно стимулируют α_2-адренорецепторы, расположенные на пресинаптической мембране, а фенилэфрин и метоксамин преимущественно активируют постсинаптические α_1-адренорецепторы этой артерии. Иохимбин и особенно его диастереоизомер рауволсцин проявляют свойства избирательных антагонистов отмеченных α_2-адренорецепторов, а празосин и другой диастереоизомер иохимбина коринантин — свойства избирательных антагонистов α_1-адренорецепторов.

Во всех других изучаемых органах и тканях (сердце и глазная артерия кроликов, сердце и *vas deferens* крыс, сосуды кошек, сердце собаки, *vas deferens* мышей) пресинаптические α-адренорецепторы имели такую же чувствительность к агонистам и антагонистам, как и α_2-адренорецепторы лёгочной артерии кроликов.

Кроме того, пресинаптические α_2-адренорецепторы обнаружены в холинергических, серотонинергических нервных окончаниях и на телах адренергических нейронов. Эти α_2-адренорецепторы опосредуют ингибирование высвобождения ацетилхолина, серотонина и гиперполяризацию мембран норадренергических нейронов соответственно.

Пресинаптические α_2-адренорецепторы, регулирующие высвобождение норадреналина и серотонина в ЦНС, представляют собой стереохимически различные подтипы α_2-адренорецепторов.

Считается, что α_2-рецепторы ЦНС принимают участие в регуляции артериального давления, опосредуют седативный и противосудорожный эффект, а также регулируют температуру тела, процессы саливации и высвобождение АКТГ.

В ЦНС α_2-адренорецепторы расположены не только на пресинаптических, но также и на постсинаптических мембранах. Пресинаптические α_2-адренорецепторы составляют меньшую часть всех α_2-адренорецепторов в ЦНС. Основанием такого заключения послужили работы, в которых установлено слабое влияние деструкции норадренергических нервных окончаний, вызванной 6-оксидофамином, на число участков клеток головного мозга, связывающих ^{3}H-клонидин.

Вопрос о локализации и функции центральных α_2-адренорецепторов во многом ещё не ясен. Решение его имеет большое практическое значение, так как есть все основания предполагать, что α_2-адренорецепторы в ЦНС участвуют в регуляции различных функций сердечно-сосудистой системы. Постсинаптические α_2-адренорецепторы были обнаружены позднее, чем пресинаптические. Оценивая способность ряда веществ ингибировать сокращение изолированных отрезков артерии ладони человека, и установили, что блокатор α_1-адренорецепторов празосин в этом отношении неэффективен. В то же время празосин подавляет сократительное действие норадреналина на сосуды кишечника человека. Поэтому можно сделать вывод о существовании в неисчерченных мышцах сосудов человека празосинрезистентных, или α_2-адренорецепторов, и празозинчувствительных, или α_1-адренорецепторов. Смешанный антагонист α_1- и α_2-адренорецепторов фентоламин ингибирует эффект норадреналина во всех случаях.

В последующем α_2-адренорецепторы наряду с α_1-адренорецепторами были идентифицированы на пост-синаптических структурах сердца и сосудов крыс, кролика, собак.

Постсинаптические α_1- и α_2-адренорецепторы имеют различную чувствительность не только к антагонистам, но и к агонистам. У крыс стимуляция α_1-адренорецепторов наблюдается при введении им (−)-фенилэфрина, а стимуляция α_2-адренорецепторов — при введении азепексола. В основном все эксперименты, доказывающие существование так называемых сосудосуживающих α_2-адренорецепторов, были проведены *in vivo*. В то же время результаты, полученные на мышцах сосудов *in vitro*, неоднозначны в отношении присутствия α_1- и α_2-адренорецепторов. α-Адренорецепторы сосудов человека отличаются как от α_1-, так и от α_2-адренорецепторов или представляют собой смешанную популяцию двух типов или более рецепторов. α-Адренорецепторы вен отличаются от рецепторов, присутствующих в артериях, и не подавляются празозином.

α-Адренорецепторы имеют также видовые отличия. При сравнении постсинаптических α-адренорецепторов аорты шести видов млекопитающих выявлено, что иохимбину и клонидину свойственно наибольшее сродство к α-адренорецепторам аорты крыс, промежуточное к α-адренорецепторам аорты хомячков, кошек и собак и наименьшее — к α-рецепторам аорты морских свинок и кроликов.

В отношении постсинаптических α-рецепторов аорты крыс можно указать, что имеющиеся сведения не позволяют их отнести только к подклассу α_1- или α_2-адренорецепторов.

Вместе с тем использование высокоизбирательных α_2-адренергических стимуляторов и блокаторов позволило идентифицировать α_2-адренорецепторы в опытах на базилярной артерии собаки, *v. saphene* собак и на сосудах перфузируемой задней части туловища.

Кроме того, α_2-адренорецепторы присутствуют на энтероцитах подвздошной кишки кролика, жировых клетках человека и хомячков, клетках островков поджелудочной железы мышей, тромбоцитах человека и кролика и меланоцитах ящериц и лягушек. Данные рецепторы опосредуют стимуляцию транспорта ионов через мембрану, ингибирование липолиза, вызываемого теофеллином, ингибирование высвобождения инсулина, агрегацию тромбоцитов и угнетение диспергирования гранул в меланоцитах, вызываемого меланоцитстимулирующим гормоном, соответственно.

Предполагается, что постсинаптические α_2-адренорецепторы не обязательно локализованы в непосредственной близости от норадренергических нервных окончаний и могут подвергаться воздействию экзогенного норадреналина в большей степени, чем эндогенного нейромедиатора, высвобождающегося в синаптическую щель. В то же время α_1-адренорецепторы повсеместно в организме расположены на постсинаптических мембранах в непосредственной близости от норадренергических нервных окончаний.

В 1990-е гг. с помощью метода гибридизации, как и в случае α_1-адренорецепторов, была выяснена номенклатура α_2-адренорецепторов — подтипов α_{2A}, α_{2B}, α_{2C} α-адреноредоцепторов, а с помощью гибридизации *in situ* определена их локализация в центральной нервной системе человека и крыс. Сродство радиолигандов к α_{1A}-адренорецепторам уменьшается в ряду: иохимбин > оксиметазолин > адреналин > празозин > норадреналин; к α_{2B}-адренорецепторам: иохимбин > фентоламин > > празозин > норадреналин > оксиметазолин > адреналин; к α_{2C}-адренорецепторам: иохимбин > фентоламин > празозин > оксиметазолин > адреналин > норадреналин.

Учитывая приведённые данные, а также литературные сведения можно предложить следующую классификацию.

1. Постсинаптические α_1-адренорецепторы.

1. α_1-Адренорецепторы неисчерченных мышц сосудов и мочеполовых органов (сокращение).

2. α_1-Адренорецепторы сердца (положительный инотропный эффект, аритмия).

3. α_1-Адренорецепторы печени (гликогенолиз, глюконеогенез).
4. α_1-Адренорецепторы ЦНС (стимуляция).
5. α_1-Адренорецепторы жировой ткани (стимуляция обмена фосфолипидов).
6. α_1-Адренорецепторы экзокринных желёз (стимуляция секреции).
7. α_1-Адренорецепторы эпителиальных клеток кишечника (стимуляция трансэпителиального переноса жидкости).
8. α_1-Адренорецепторы гладких мышц кишечника (гиперполяризация, расслабление)

II. Постсинаптические α_2-адренорецепторы.

1. α_2-Адренорецепторы гладких мышц сосудов и других органов (сокращение).
2. α_2-Адренорецепторы жировых клеток (ингибирование липолиза).
3. α_2-Адренорецепторы β-клеток островков поджелудочной железы (ингибирование секреции инсулина).
4. α_2-Адренорецепторы тромбоцитов (агрегация).
5. α_2-Адренорецепторы меланоцитов (ингибирование диспергирования меланиновых гранул).
6. α_2-Адренорецепторы клеток ЦНС (поведенческие реакции).
7. α_2-Адренорецепторы симпатических ганглиев (гиперполяризация).
8. α_2-Адренорецепторы энтероцитов (стимуляция транспорта ионов через мембрану).

III. Пресинаптические α_2-адренорецепторы.

1. α_2-Адренорецепторы в центральных и периферических норадренергических нервных окончаниях (ингибирование высвобождение норадреналина).
2. α_2-Адренорецепторы в серотонинергических нейронах (ингибирование высвобождения серотонина).
3. α_2-Адренорецепторы в холинергических нейронах (ингибирование высвобождение ацетилхолина).

Молекулярная фармакология α-адренорецепторов. Многие данные, касающиеся молекулярных механизмов взаимодействия лигандов с этими рецепторами, получены при изучении зависимости физиологических эффектов, опосредуемых α-адренорецепторами, от химической структуры агонистов и антагонистов, а также конкурентных взаимоотношений между ними и радиолигандами за связь с α-адренорецепторами.

Ещё в 1933 г. при изучении зависимости физиологической активности некоторых адренергических веществ от их структуры была сформулирована гипотеза, согласно которой α-адренергическая активность уменьшается в следующем ряду: R(−)-соединение > S(+) = соединение = дезоксисоединение [2].

Исходя из этих данных следует считать, что у молекулы, обладающей асимметричным центром (R = (−)-норадреналин), 3 из 4 групп асимметричного атома углерода принимают участие в связывании с адренорецепторами. Данными группами являются основная аминогруппа, ароматическое кольцо с гидроксилами и бензольная оксигруппа. Для S = (+)-норадреналина и дезоксисоединения (дофамина) в таком случае имеется возможность взаимодействия только с двумя участками α-адренорецепторов.

При изучении действия R(−)- и R(+)-норадреналина, дофамина, R(−)- и S(+)-2-(3,4,α-триоксибензил)имидазолина и 2-(3,4-диоксибензил)имидазолина на α_1-адренорецепторы аорты и α_2-адренорецепторы подвздошной кишки морской свинки было выявлено, что фенетиламины и имидазолины могут различно взаимодействовать с α-адренорецепторами. Было обнаружено, что удаление одной или обеих гидроксильных групп катехольного кольца приводит к полной потере антагонистами актив-

ности по отношению к α_2-адренорецепторам, но лишь уменьшает её по отношению к α_1-адренорецепторам. В то же время как для фенетиламинов, так и для имидазолинов присутствие 3,4-диоксикатехольной группы было оптимально для проявления их α-адренергической активности. Для обоих классов агонистов активность по отношению к α_1-адренорецепторам в зависимости от характера заместителей уменьшалась в следующем порядке: 3,4-диокси- > 3-окси- > 4-окси- > фенольная группа. Если бензольная гидроксильная группа не играла большой роли в эффективности обоих классов агонистов, то она оказывала заметное противоположное влияние на сродство фенетиламинов и имидазолинов к α_1-адренорецепторам.

Следовательно, ароматические и бензольные гидроксильные группы по-разному влияют на взаимодействие имидазолинов и фенетиламинов с α-адренорецепторами. Причину этих различий на молекулярном уровне ещё предстоит изучить.

Если о сродстве производных бензодиоксана к α_1- и α_2-адренорецепторам судить по их способности вытеснять ^{3}H-празозин и ^{3}H-клонидин, соответственно из их комплексов с мембранами головного мозга крыс, то можно обнаружить, что изменение в структуре бензодиоксанов заметно влияет на их сродство к α_1-адренорецепторам и слабо влияет на их сродство к α_2-адренорецепторам. Бензодиоксаны имеют сродство к α_1-адренорецепторам намного выше, чем к α_2-адренорецепторам. Наибольшей избирательностью по отношению к α_1-адренорецепторам обладает вещество UK-33 274. Отметим, что величины избирательности бензодиоксанов к α_1- и α_2-адренорецепторам коррелируют с их способностью подавлять сужение сосудов, опосредуемое этими рецепторами. Обсуждая зависимость сродства бензодиоксанов к α_1-адренорецепторам от их структуры, можно сказать следующее. Наличие двух метокси-групп в положениях 2 и 6 предопределяет высокое сродство соединения к этим рецепторам. Удаление одной из этих метоксигрупп снижает данное сродство, а включение 4-окси-группы его увеличивает. Кислородный атом в боковой цепи не имеет большого значения для сродства вещества к α_1-адренорецепторам. Большая роль здесь принадлежит вторичной аминогруппе, так как алкилирование её снижает сродство соединения к α_1-адренорецепторам. Связывание бензодиоксанов с α-адренорецепторами стереоспецифично, ибо зависит от конфигурации вокруг центра асимметрии в боковой цепи соединений.

В качестве ещё одной иллюстрации стереоспецифического характера взаимодействия α-адренорецепторв с их антагонистами можно привести данные о том, что S-пипероксан по сравнению с R-пипероксаном обладает в 18 раз большей способностью подавлять α-адренергическую активность адреналина.

В результате взаимодействия катехоламинов с α_1-адренорецепторами плазматических мембран гепатоцитов; по-видимому, происходят конформационные изменения рецепторов, которые являются пусковым механизмом, инициирующим цепь метаболических превращений в клетке, характеризующихся изменением тока Ca^{2+} и K^+ через мембрану, распадом гликогена, высвобождением глюкозы с соответствующими изменениями активности ферментов обмена углеводов и др.

Исследования по выяснению физико-химических свойств α-адренорецепторов показали возможность солюбилизации α-адренергических рецепторов из мембран тромбоцитов человека с помощью дигитонина. Относительная эффективность, с которой различные лиганды вытесняли ^{3}H-йохимбин из его связи с солюбилизированными рецепторами, указывает на их отношение к α_2-адренорецепторам. Если рецепторы в составе мембран метили ^{3}H-йохимбином или ^{3}H-норадреалином, а затем солюбилизировали и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы, то коэффициент седиментации α-адренорецепторов, меченных агонистом (14,6S), превышал коэффициент седиментации α-адренорецепторов, меченных антагонистом (12,9S). Авторы предполагают, что более высокий коэффициент седиментации комплекса рецептор–

агонист отражает присутствие в этом комплексе ГТФ-связывающего регуляторного белка.

После мечения ^{3}H-феноксибензамином α_1-адренорецепторов плазматических мембран гепатоцитов крыс их можно солюбилизировать тритоном X-100. Выделенный комплекс белковой природы имел радиус Стокса 6 нм. Электрофорез меченных ^{3}H-феноксибензамином препаратов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих условиях позволил выделить два радиоактивных пика с $M_r = 80\,000$ и 58 000, причём второй может быть протеолитическим фрагментом первого.

При дальнейшем изучении α-адренорецепторов были применены методы молекулярной биологии — клонирования генов рецепторов.

Для 6 подтипов α-адренорецепторов клонированы 6 различных генов [3]. В мембранных доменах среди подтипов α_1-адренорецепторов имеется сходство в 75% аминокислотных остатков, а между α_1-адренорецепторами и α_2-адренорецепторами, так же как и β-адренорецепторами, гомология составляет 30–40%.

Изучение биохимических механизмов, обеспечивающих трансформацию молекулярного сигнала, передаваемого клетке посредством α_1-адренорецепторов, в основном проводят на клетках печени. Хотя α_1-адренорецепторы этого органа выявлены сравнительно недавно, они наиболее подробно изучены в отношении молекулярных механизмов, вовлечённых в α-адренергический ответ клетки. Связано это, по-видимому, с относительной лёгкостью получения препаратов печени (изолированная перфузируемая печень, срезы печени, изолированные гепатоциты и др.) и с достаточно полными данными о функциональной биохимии клеток печени.

Существуют убедительные доказательства, что индукция катехоламинами метаболических изменений в гепатоцитах обусловлена их взаимодействием с α-адренорецепторами, расположенными на поверхности клеток, а не с внутриклеточными структурами. Наиболее важные их них следующие:

1) на внутриклеточных органеллах клеток печени нет катехоламинергических рецепторов;

2) адреналин быстро метаболизируется после проникновения в клетки печени;

3) адреналин, сшитый ковалентно с кополипептидом (13 К), который обладает большой молекулярной массой и не позволяет адреналину проникать внутрь клеток, проявляет всё те же эффекты при добавлении его к изолированным гепатоцитам или перфузируемой печени крыс, что и свободный адреналин.

Установлено, что α_1-адренорецепторы опосредуют стимуляцию агонистами фосфорилазы печени. Празозин примерно в 100 раз сильнее, чем йохимбин, ингибировал активацию фосфорилазы и высвобождение Ca^{2+}, вызываемые адреналином. Обнаружено, что стимуляция фенилэфрином α_1-адренорецепторов перфузируемой печени крыс приводит вначале к поглощению, затем к высвобождению K^+ печенью и к увеличению потребления O_2 в период поглощения K^+. Цианид (1 мМ), вызывающий ингибирование электронного транспорта в митохондриях, не влиял на поглощение K^+, но уменьшал индуцируемую фенилэфрином продукцию лактата на 60% и снижал потребление O_2 более чем на 90%. Оубаин (0,8 мМ) не влиял на индуцируемое фенилэфрином потребление кислорода клетками печени, но ингибировал поглощение K^+ и образование лактата. Следовательно, можно считать, что АТФ, используемая для поглощения K^+ при действии фенилэфрина, образуется в процессе гликолиза, а не окислительного фосфорилирования в митохондриях и что образование лактата вторично по отношению к повышению функциональной активности Na^+, K^+-АТФазы в плазматических мембранах.

Большинство α_1-адренергических ответов клетки печени являются кальцийзависимыми. К ним относятся: 1) инактивация гликогенсинтетазы; 2) стимуляция глюко-

неогенеза; 3) инактивация пируваткиназы; 4) изменение транспорта K^+ через плазматическую мембрану и изменение её потенциала; 5) активация фосфофруктокиназы.

В качестве результатов, подтверждающих роль кальция в этих процессах, можно привести следующие данные:

1) активация гликогенолиза исчезает при инкубации гепатоцитов с ЭГТА, связывающей Ca^{2+};

2) активация имеет место при добавлении кальциевого ионофора А 23187;

3) киназа фосфорилазы β, которая переводит фосфорилазу β в фосфорилазу α, аллостерически стимулирует Ca^{2+} при его концентрации 10^{-8} и 10^{-6} М (такая концентрация Ca^{2+} обычно наблюдается в цитозоле).

Участие Ca^{2+} в реализации таких эффектов катехоламинов, как стимуляция дыхания и транспорт аминокислот, вполне вероятно, но требует дополнительных доказательств.

В связи с этим становится ясным, почему в настоящее время исследователи направили усилия на изучение механизмов индукции катехоламинами повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток печени, считая, что этот процесс происходит через посредничество α_1-адренорецепторов.

Принципиально возможны два пути увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток при α-адренергической стимуляции. Первый из них — увеличение входа Ca^{2+} в клетки из внеклеточной среды. Методами атомно-абсорбционного анализа, металлохромных красителей, хлортетрациклиновой флуоресценции и Ca^{2+}-селективных электродов не обнаружено, в ранние сроки после α-адренергической стимуляции, увеличения поглощения клетками Ca^{2+}; наоборот, выявлено повышение высвобождения Ca^{2+} из клеток. Более того, при удалении Ca^{2+} из среды инкубации с помощью ЭГТА не наблюдалось уменьшения скорости и величины стимуляции агонистами активности фосфорилазы в клетках печени. Поэтому данный механизм увеличения внутриклеточного содержания Ca^{2+} маловероятен или, если он существует, не является основным.

Вместе с тем имеется много данных в пользу второго механизма, согласно которому повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле обусловлено его мобилизацией из внутриклеточного депо. Установлено, что адреналин уменьшает содержание $^{45}Ca^{2+}$ в митохондриях на 50%. Однако вопрос, может ли Ca^{2+} высвобождаться из других структур клеток, остаётся спорным. Как уже указывалось, все эффекты агонистов α_1-адренорецепторов опосредованы их взаимодействием с поверхностью клеток. Подтверждение этого — отсутствие высвобождения Ca^{2+} из митохондрий и микросом при прямом воздействии на них адреналина в физиологических концентрациях.

Между тем возникает ещё один вопрос: какой механизм сопряжения существует между активацией α_1-адренорецепторов и высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточного депо или входом его из внеклеточной среды? По современным представлениям, определённую роль в этом сопряжении может играть обмен фосфатидилинозитола. Известно, что при инкубации гепацитов с α_1-агонистами происходит увеличение деградации фосфатидилинозитола, определяемое по повышению включения в него ^{32}P.

Есть данные, свидетельствующие, что разрушение фосфатидилинозитола, вызываемое указанными агонистами, происходит в более ранние сроки, чем изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле. При этом очень небольшие изменения в обмене фосфатидилинозитола могут вызывать максимальный физиологический ответ.

Увеличение уровня Ca^{2+} в цитозоле в результате деградации фосфатидилинозитола, катализируемой фосфолипазой С, может иметь место при высвобождении Ca^{2+} из плазматических мембран, увеличении проницаемости мембран для внеклеточного Ca^{2+} и образовании внутриклеточного посредника, вызывающего выход Ca^{2+} из

органелл. Отметим, что в настоящее время все эти механизмы относятся больше к разряду гипотетических, чем доказанных.

В связи с этим возникает третий вопрос, касающийся механизма мобилизации внутриклеточного кальция: какая молекула может рассматриваться в качестве вторичного посредника? Им вряд ли может быть инозитол-1,2-циклофосфат или инозитол-1-фосфат, поскольку они не влияют на выход Ca^{2+} из митохондрий. Фосфатидат в концентрации 10^{-4} М вызывает выход Ca^{2+} из митохондрий печени крыс, но этот эффект есть следствие разобщения окислительного фосфорилирования. Возможно также, что разрушение фосфатидилинозитола — не единственный путь влияния агонистов α_1-адренорецепторов на обмен липидов.

Имеется сообщение о том, что адреналин, действуя через α_1-адренорецепторы, стимулирует деградацию в гепатоцитах фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата, который связывает Ca^{2+} и, разрушаясь, его высвобождает. Так как эта деградация происходит более быстро, чем разрушение фосфатидилинозитола, можно предполагать, что она представляет собой первичный ответ клетки на стимуляцию α_1-адренорецепторов. Однако, опосредует ли это высвободившийся Ca^{2+} деградацию полифосфоинозитидов в печени, остаётся невыясненным (отметим, что он действует именно так в мышце радужки глаза).

Исследования последних лет показали, что в специфических ответах гепатоцитов на α-адренергическую стимуляцию принимает участие протеинкиназа, зависящая от Ca^{2+} и фосфолипидов, таких как фосфатидилсерин и диацилглицерин.

Наши представления о механизмах сопряжения α_1-адренергической стимуляции с метаболическими изменениями в клетках печени неполные и находятся на стадии создания различных гипотез. Большое значение имеют два установленных факта:

1) биологическая активность агонистов α_1-адренорецепторов опосредована их взаимодействием с этими рецепторами, находящимися только на поверхности клеток печени;

2) большинство метаболических эффектов агонистов являются кальцийзависимыми.

По-видимому, дальнейшие усилия в первую очередь необходимо направить на изучение молекулярных событий, происходящих в плазматической мембране в непосредственной близости от α_1-адренорецепторов в момент их взаимодействия с агонистами. Ими могут быть не одна, а одновременно несколько реакций, например изменение проницаемости мембран для ионов, изменения активности таких ферментов, как Na^+, K^+-АТФаза, фосфолипаза С и другие, опосредующих многие метаболические эффекты внутри клеток, о которых уже говорилось.

α_1-Адренергические механизмы в других органах и тканях исследованы менее подробно, чем в печени. Однако в основном эти механизмы сходны между собой. Большинство гладкомышечных органов отвечают на α-адренергическую стимуляцию сокращением, связанным с повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+}. Сокращение неисчерченных мышц происходит в результате стимуляции Ca^{2+} кальмодулинзависимой киназы лёгких цепей миозина, катализирующей их фосфорилирование, необходимое для его взаимодействия с актином в неисчерченных мышцах. α_1-Агонисты могут вызывать физическое или тоническое сокращение неисчерченных мышц. Физическое сокращение происходит при отсутствии внеклеточного Ca^{2+}, что свидетельствует о мобилизации Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, митохондрий или плазматических мембран. В то же время тоническое сокращение осуществляется только при наличии внеклеточного Ca^{2+}. Предполагается, что индукция α_1-агонистами сокращений неисчерченных мышц сопровождается метаболизмом фосфатидилинозитола как регулятора проницаемости мембран для Ca^{2+}. Подтверждением

этого служит тот факт, что фосфатидат, образующийся в процессе метаболизма фосфатидилинозитола, вызывает сокращение неисчерченных мышц.

α_1-Антагонист празозин по сравнению с α_2-антагонистом йохимбином на 3 порядка сильнее ингибирует стимулируемый норадреналином вход ^{45}Ca в миоциты изолированной аорты кроликов и высвобождение в них внутриклеточного Ca^{2+}. Полученные результаты не подтверждают гипотезу, согласно которой α_1- и α_2-адренорецепторы специфически сопряжены с входом Ca^{2+} или высвобождением Ca^{2+}, а свидетельствуют о том, что один подтип этих рецепторов может опосредовать оба процесса. Авторы считают, что различие в чувствительности к кальциевым антагонистам, наблюдаемое при использовании различных агонистов α_1- и α_2-адренорецепторов для активации сужения сосудов, обусловлено неодинаковой стимуляцией рецептор-активируемого кальциевого канала. Кроме индукции α_1-агонистами в миоцитах повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+}, в ряде случаев отмечено увеличение содержания цГМФ в *vas deferens* и в желудке. цГМФ сам по себе не вызывает сокращения мышц, и гуаниновые нуклеотиды (ГТФ и 5′-гуанилимидофосфат) не уменьшают сродства адреналина и фенилэфрина к α_1-адренорецепторам неисчерченных мышц. Не обнаружили влияния гуанинового нуклеотида ГФФ(NH)Ф на способность адреналина конкурировать с ^{3}H-празозином и ^{125}I-BE2254 за связывание с α_1-адренорецепторами мембран сердца крыс. Заметим, однако, что гуаниновые нуклеотиды снижают сродство катехоламинов к β-адренорецепторам.

Рассмотрим теперь имеющиеся сведения об α_1-адренергических механизмах в ЦНС. Выявлено, что стимуляция α_1-адренорецепторов клеток головного и спинного мозга приводит и к повышению обмена фосфатидилинозитола и к повышению внутриклеточного уровня цАМФ. Между способностью адренергических агонистов конкурировать с α_1-антагонистом WB4101 за связывание с мембранами головного мозга и индуцировать накопление цАМФ в головном мозге имела место корреляция.

Обнаружено, что степень повышения цАМФ в головном мозге зависит от концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде. Кроме того, в аккумуляции цАМФ, по-видимому, играют роль простагландины группы Е. Это наблюдение подтверждается уменьшением способности α_1-агонистов вызывать накопление цАМФ в срезах коры и гипоталамуса в присутствии ингибиторов простагландинсинтазы и восстановление этой способности после добавления простагландина E_2.

Важно отметить, что особенностью α_1-адренергических механизмов в ЦНС является сопряжение стимуляции α_1-адренорецепторов с изменением внутриклеточного уровня цАМФ, так как данной реакции в других тканях, содержащих α_1-адренорецепторы, не наблюдалось.

В жировых клетках α_1-агонисты увеличивают активность фосфорилазы, инактивируют гликогенсинтетазу, повышают включение ^{32}P в фосфатидилинозитол, выход $^{42}K^{+}$ и поглощение кислорода. Описанные эффекты уменьшались при снижении концентрации внеклеточного Ca^{2+} и могли быть вызваны кальциевым ионофором А23187. По-видимому, они связаны с повышением уровня Ca^{2+} в адипоцитах.

Воздействие α_1-агонистов на околоушную и другие слюнные железы, а также на слёзную железу приводит к увеличению проницаемости мембран клеток этих желёз для K^{+} с последующим выходом воды из клеток. Повышению калиевой проницаемости предшествовало увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+}. Предполагается, что, как и в случае клеток печени, изменение ионных токов в клетках этих желёз при α_1-адренергической стимуляции сопряжено с изменением обмена фосфолипидов и участием в этом процессе фосфатидата.

Заканчивая рассмотрение α_1-адренергических механизмов, подчеркнём, что стимуляция α_1-адренорецепторов, за исключением клеток ЦНС, не сопряжена с изменением уровня цАМФ, а сопровождается повышением внутриклеточной концентрации

Ca^{2+}. Данное повышение может быть обусловлено входом внеклеточного Ca^{2+} через кальциевые «ворота» в плазматической мембране или высвобождением Ca^{2+} из его связи с внутриклеточными органеллами и плазматической мембраной. Молекулярные механизмы, лежащие в основе увеличения внутриклеточного уровня Ca^{2+} могут быть различны.

Активация α_1-адренорецепторов приводит к образованию внутриклеточного посредника в плазматической мембране, который, далее действуя на митохондрии и, вероятно, эндоплазматический ретикулум, вызывает высвобождение связанного с ним Ca^{2+}.

Возможно, роль этого внутриклеточного посредника выполняет продукт метаболизма фосфолипидов — фосфатидат. Следует особо подчеркнуть, что во многих тканях активация α_1-адренорецепторов, так же как и М-холинорецепторов, сопряжена с увеличением обмена фосфатидилинозитола. Теоретически α_1-адренорецепторы могут регулировать активность фосфолипазы С, катализирующей гидролиз фосфатидилинозитола в плазматической мембране. Данный гидролиз может, во-первых, приводить к открытию «кальциевых ворот»; во-вторых, сопровождаться образованием фосфатидата (или другого вторичного внутриклеточного посредника).

Повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле при активации α_1-адренорецепторов можно объяснить многие эффекты, наблюдающиеся после α-адренергической стимуляции. Кальций, связываясь с кальмодулином, активирует протеинкиназы, катализирующие фосфорилирование тех или иных клеточных белков, вовлечённых в специфический α_1-адренергический ответ клетки. Безусловно, данная гипотеза не исчерпывает других механизмов реализации кальцийзависимых и кальцийнезависимых эффектов α_1-адренергических средств.

Установлено, что α_1-адренорецепторы сопряжены посредством G_q-белка с фосфолипазами С, D или A_2, обусловливая их активацию. При этом, как уже говорилось ранее, сами узнающие участки данных рецепторов гетерогенны: α_{1A}-рецепторы локализованы в сердце, печени, коре мозжечка, простате, лёгких, семявыводящем протоке (селективный антагонист 5-метилурапидил), α_{1B}-рецепторы — в почках, селезёнке, аорте, лёгких, коре мозжечка (селетивный антагонист WB4101), α_{1D}-рецепторы — в аорте, коре мозжечка, простате, гиппокампе.

Природные агонисты адреналин и норадреналин проявляют относительную неизбирательность в отношении α_1- и α_2-адренорецепторов. Поэтому их α-адренергические эффекты в различных тканях определяются плотностью α_1- и α_2-адренорецепторов в них. Например, тромбоциты содержат только α_2-адренорецепторы, а околоушная железа — в основном α_1-адренорецепторы. В то же время в некоторых тканях присутствуют одновременно оба подтипа этих рецепторов (это справедливо в отношении мышц матки, головного мозга и адипоцитов), что затрудняет анализ рецепторного связывания и последующего метаболического ответа клетки. Создание избирательных агонистов и антагонистов позволило лучше изучить природу и функцию этих рецепторов, но и в проблеме сопряжения активации α-адренорецепторов с возникновением физиологической реакции ещё много неясного.

Поскольку существуют пост- и пресинаптические α_2-адренорецепторы, различающиеся между собой по локализации и функции, необходимо рассматривать отдельно и α_2-адренергические механизмы этих рецепторов.

Общим свойством всех постсинаптических α_2-адренорецепторов является индукция снижения внутриклеточного уровня цАМФ посредством ингибирования аденилатциклазы.

Обнаружено, что для проявления ингибирующего действия α_2-агонистов на аденилатциклазу тромбоцитов необходимо присутствие ГТФ. Под действием α_2-агони-

стов снижается V_{max} аденилатциклазы, но не изменяется её сродство к Mg^{2+}, АТФ или свободному Mg^{2+}.

При повышении концентрации Na^+ в среде инкубации тромбоцитов наблюдалось усиление ингибирующего действия адреналина на аденилатциклазу и уменьшение способности α_2-адренорецепторов тромбоцитов связывать катехоламины.

Поскольку гуаниновые нуклеотиды снижают сродство α_2-адренорецепторов тромбоцитов к агонистам, но не к антагонистам, предполагается, что α_2-адренорецепторы могут находиться в двух состояниях и гуаниновые нуклеотиды переводят рецепторы с высоким сродством в состояние с низким сродством. Другими словами, в данном случае гуаниновые нуклеотиды выполняют функции модуляторов.

Вместе с тем при полном активировании аденилатциклазы тромбоцитов стабильными аналогами ГТФ, ГФФ(NH)Ф/ГФФ(CH_2)Ф и ГТФ-γ-S, фермент теряет чувствительность к ингибирующему эффекту адреналина как в присутствии, так и отсутствии ГТФ. Кроме того, эти аналоги обращали ингибирование аденилатциклазы адреналином и ГТФ.

Принимая во внимание эти результаты, можно постулировать: 1) ингибирование адреналином аденилатциклазы тромбоцитов происходит вследствие инактивации каталитически активной формы фермента; 2) этот процесс может быть связан со стимуляцией ГТФазы, сопряжённой с аденилатциклазной системой.

По-видимому, α_2-агонисты вызывают ассоциацию α_2-адренорецепторов с регуляторной мембранной компонентой (возможно, ГТФ-азой) аденилатциклазы, а гуаниновые нуклеотиды дестабилизируют этот комплекс. Доказательством приведённого предположения может служить тот факт, что комплекс меченый агонист — α_2-адренорецептор, выделенный из тромбоцитов человека, имеет коэффициент седиментации 4,6S, а комплекс меченый антагонист — α_2-адренорецептор — 12,9S.

Показано, что специфическое связывание антагониста α_2-адренорецепторов ^{3}H-иохимбина с интактными тромбоцитами человека характеризуется константой диссоциации, равной 2–7 нМ, и числом связывающих участков, равным 200–400 на тромбоцит. Концентрация адреналина, при которой наблюдалось ингибирование накопления цАМФ в тромбоцитах, составляла от величины его концентрации, при которой имело место ингибирование связывания ^{3}H-иохимбина. В то же время концентрация иохимбина, при которой происходило ингибирование действия адреналина на аденилатциклазу, была в 10 раз больше той, которая необходима для оккупации α_2-адренорецепторов. Значит, эти результаты указывают, что ингибирование аденилатциклазы вызывается образованием короткоживущего комплекса агонист–рецептор–аденилатциклаза.

В присутствии одновалентных ионов (Li^+, Na^+, K^+) и концентрации ГТФ больше 1 мкМ при активации α_2-адренорецепторов плазматических мембран клеток печени происходит ингибирование аденилатциклазы. В то же время при отсутствии одновалентных ионов, но в присутствии ЭГТА и низких концентраций ГТФ ($< 0{,}1$ мкМ) стимуляция этих рецепторов сопровождается повышением активности аденилатциклазы: данный эффект был обратимым при добавлении к среде инкубации Mg^{2+} или Ca^{2+}. Другими словами, в зависимости от концентраций ГТФ и катионов сопряжение α_2-адренорецепторов плазматических мембран носит положительный или отрицательный характер. По-видимому, Mg^{2+}, Ca^{2+} и Na^+ регулируют сопряжение α_2-адренорецепторов со стимулирующими или ингибирующими аденилатциклазу белками, связывающими гуаниновые нуклеотиды.

Na^+ (140 нМ) и ГТФ (0,1 мМ) увеличивают концентрацию аминоклонидина, при которой наблюдается вытеснение ^{3}H-клонидина из его связи с α_2-адренорецепторами плазматических мембран энтероцитов подвздошной кишки кроликов. Связывание агонистов с α_2-адренорецепторами ЦНС снижается в присутствии гуаниновых нук-

леотидов. Это снижение обращается двухвалентными катионами. В коре головного мозга найдены α_2-адренорецепторы с высоким и низким сродством. Гуаниновые нуклеотиды уменьшают число рецепторов с высоким сродством, а Mn^{2+}, Mg^{2+} и Ca^{2+} (0,01–1 мМ) их увеличивают. При совместном же воздействии двухвалентных катионов и ГТФ число α_2-адренорецепторов значительно увеличивается. В отличие от двухвалентных катионов Na^+ уменьшает число α_2-адренорецепторов как с высоким, так и с низким сродством. Отметим, что эти данные относятся ко всем адренорецепторам ЦНС, а не отдельно к пре- или постсинаптическим.

Об α_2-адренергических механизмах в неисчерченных мышцах сведений мало. Известно только, что внеклеточный Ca^{2+} необходим для сокращения неисчерченных мышц, опосредуемых α_2-адренорецепторами. Поскольку Na_2-ЭДТА и блокаторы входа Ca^{2+} в клетку ингибируют сокращения мышц сосудов при активации α_2-адренорецепторов, можно считать, что внеклеточный Ca^{2+} играет триггерную роль в сокращении мышечной оболочки сосуда. Вместе с тем показано, что α_2-адренергическая стимуляция сопровождает ингибирование аденилатциклазы в жировой ткани в клетках гибрида нейробластомы и глиомы, в щитовидной железе, в корковом веществе почек и в околоушной железе. Это ингибирование имело место только при наличии ГТФ и одновалентных катионов.

При угнетении аденилатциклазы, обусловленном α_2-адренергической стимуляцией, имело место снижение уровня цАМФ в клетках островков поджелудочной железы, желчного пузыря, кожи лягушки, щитовидной, околоушной желёз, прямой кишки, сердца и в глиальных клетках.

Таким образом, можно резюмировать, что, как правило, активация постсинаптических α_2-адренорецепторов приводит к снижению концентрации цАМФ в клетках. Снижение концентрации цАМФ, по-видимому, связано со снижением активности аденилатциклазы. Для этого ингибирования необходимо присутствие ГТФ. Именно ГТФ и ингибирующий ГТФ-связывающий белок, вероятно, ответственны за сопряжение между α_2-адренорецепторами и каталитическим компонентом аденилатциклазы в момент взаимодействия α_2-адренорецепторов с их агонистами.

Теперь несколько слов о пресинаптических α_2-адренергических механизмах. При воздействии на пресинаптические α_2-адренорецепторы происходит изменение проницаемости пресинаптических мембран для Ca^{2+} и K^+, уровня цАМФ и цГМФ и увеличение активности Na^+, K^+-АТФазы.

Обнаружено, что кальциевый антагонист Cd^{2+} и норадреналин ингибируют электрически стимулируемое высвобождение ^{3}Н-норадреналина из срезов коры головного мозга крыс. Данный эффект Cd^{2+} и норадреналина уменьшался в присутствии 4-амидопирина и восстанавливался при снижении внеклеточной концентрации Ca^{2+}. Блокирование пресинаптических рецепторов фентоламином не влияло на ингибирующие эффекты Cd^{2+}.

В присутствии тетродоксина норадреналин сильно уменьшал высвобождение ^{3}Н-норадреналина, вызываемое K^+ (20 мМ). Можно заключить, что пресинаптические α_2-адренорецепторы принимают участие в регуляции секреции медиатора на этапе, следующем за входом Ca^{2+}.

Можно полагать, что после проникновения в клетку Ca^{2+} связывается с внутриклеточным рецептором, например кальмодулином (повсеместно распространённый кальцийсвязывающий белок), который необходим для стимуляции экзоцитоза. Известно, что в нейрональных клетках α_2-агонисты вызывают снижение уровня цАМФ и повышают уровень цГМФ, а дибутирил цГМФ имитирует тормозящее действие оксиметазолина на высвобождение ^{3}Н-норадреналина. Следовательно, в качестве посредника влияния α-адренергической стимуляции на кальцийсвязывающие внутриклеточные участки, ответственные за секрецию нейромедиатора, может выступать

цАМФ и/или цГМФ. Однако роль цАМФ и цГМФ в этих процессах необходимо уточнить.

Согласно современным представлениям в качестве трансдуктора α_2-рецепторов может быть G_i-белок, опосредующий ингибирование аденилатциклазы или стимуляцию калиевых каналов или G_o-белок, опосредующий стимуляцию кальциевых каналов L- или N-типа, а также влозможно $G_{i/o}$ — белок, опосредующий активацию фосфолипазы С и A_2. Гетерогенность α_2-рецепторов выражается в том, что α_{2A}-рецепторы локализованы в тромбоцитах, коре головного мозга, спинном мозге (селективный агонист оксиметазолин), α_{2B}-рецепторы — в печени и почках (селективный антагонист празозин), α_{2C}-рецепторы — в коре головного мозга (селективный антагонист празозин).

4.1.2. β-Адренорецепторы. β-Адренорецепторы, как и α-адренорецепторы, не являются гомогенными. Антагонисты β-адренорецепторов с алкильными заместителями у α-углеродного атома этаноламиновой боковой цепи обладают различной способностью блокировать сосудистые и сердечные эффекты катехоламинов. Разделять β-адренорецепторы на β_1 и β_2 начали после выявления различий в действии адренергических агонистов на те или иные органы. Рецепторы сердца и жировой ткани были ими отнесены к β_1-адренорецепторам, а бронхов и мышц сосудов — к β_2-адренорецепторам [2–8].

Существование нескольких подклассов β-адренорецепторов подтвердилось тем, что одни антагонисты (практолол, атенол, метопролол) более эффективно блокировали действие катехоламинов на сердце, а другие (салбутамол, сотеренол) обладали избирательностью по отношению к бронхам.

Считается, что β_1-адренорецепторы имеют примерно одинаковую чувствительность к адреналину и норадреналину; они главным образом присутствуют в сердце, жировой ткани, сосудах и головном мозге. В то же время β_2-адренорецепторы имеют большее сродство к адреналину, чем к норадреналину; Они обнаружены в лёгких, печени, исчерченных мышцах и неисчерченных мышцах различных органов.

В связи с ограниченным доступом некоторых ЛВ к рецепторам, избирательным поглощением и деградацией их в тканях трудно определить точную фармакологическую специфичность β_1- и β_2-адренорецепторов. Фармакологический ответ, опосредуемый β-адренорецепторами, зависит не только от специфичности самих рецепторов, но и от фармакокинетики веществ-индикаторов. β_1-Адренорецепторы входят в состав синапсов и реагируют в основном на высвобождающийся из нервных окончаний норадреналин, а β_2-адренорецепторы расположены внесинаптически и реагируют в первую очередь на катехоламины циркуляторного русла.

Тот или иной орган может содержать не только один подтип β-адренорецепторов. Поэтому неодинаковая фармакологическая специфичность различных тканей может быть обусловлена вариациями в соотношении подтипов данных рецепторов (β_1/β_2).

Для исследования более точных характеристик подтипов β-адренорецепторов в последнее время разработаны и широко используются генетические и биохимические методы анализа β-адренорецепции по клонированию специфических мРНК и связыванию радиолигандов. Наиболее значительным в развитии этого направления стало создание адренергических соединений, меченных одновременно радиоактивной и фотоаффинной метками, что позволяет изучать физико-химические свойства рецепторных молекул.

Для исследования связывающей способности β-адренорецепторов наиболее часто используют два β-адреноблокатора — ^{3}H-дигидроалпренолол и ^{125}I-йодоксибензилпиндолол. При проведении подобных экспериментов обычно изучается конкуренция ряда фармакологических веществ, обладающих тропностью по отношению к β_1-адре-

норецепторам (агонисты: норадреналин, H110/38; антагонисты: практолол, атенолол, метопролол, окспренолол) или к β_2-адренорецепторам (зинтерол, салметамол, тербуталин, салбутамол, эритропрокатерол; антагонисты: TPS 339, FCJ 118 551).

Важно отметить, что специфичность данных веществ, определяемая по их способности ингибировать связывание радиолигандов с β-адренорецепторами *in vitro*, коррелирует с их специфичностью в отношении фармакологических эффектов *in vivo*. Другими словами, вещества, избирательные к β_1-адренорецепторам в экспериментах по связыванию, обладают кардиотропностью *in vivo*, а вещества, избирательные к β_2-адренорецепторам в экспериментах по связыванию, обладают бронхотропностью *in vivo*. Однако ни одно из этих соединений не имеет абсолютной избирательности и большинство из них лишь в 20–50 раз отличается по своему сродству к β_1- и β_2-адренорецепторам.

В результате анализа ингибирования избирательным антагонистом β_1-адренорецепторов атенололом и избирательным антагонистом β_2-адренорецепторов ICI 118 551 связывания (−)-^{3}H-дигидроалпренолола с мембранами клеток различных тканей млекопитающих получены данные о соотношении между β_1- и β_2-адренорецепторами в этих тканях.

Селективным лигандом β_3-адренорецепторов является 3-^{125}I-йодцианпиндолол.

Важно отметить, что β-адренорецепторы в том или ином органе могут располагаться как в кровеносных сосудах, так и непосредственно на клеточных элементах этого органа. β-Адренорецепторы в лёгких распределены диффузно и имеются в крупных и мелких бронхах, а также в их кровеносных сосудах. Поэтому, по нашему мнению, при фармакологическом анализе подтипов β-адренорецепторов в различных тканях необходимо дифференцировать принадлежность их к тому или иному виду клеточной популяции.

Вариабельность β-адренорецепторов имеет большое теоретическое и практическое значение и стала предметом интенсивных исследований лишь в последние годы. Выявлено изменение как числа β-адренорецепторов, так и соотношение их подтипов при различных воздействиях.

Обнаружено, что введение здоровым добровольцам эфедрина (200 мг/день) или тербуталина (15 мг/день) в течение 8 сут приводит к снижению числа β-адренорецепторов на мембранах лимфоцитов примерно на 50%. После прекращения введения эфедрина и тербуталина число β-адренорецепторов на мембранах лимфоцитов возвращалось к исходному уровню через 7 и 4 сут соответственно.

В экспериментах *in vitro* также наблюдалось снижение числа β-адренорецепторов при воздействии агонистов этих рецепторов. Так, изопротеренол (91 мкМ) вызывал транзиторное уменьшение числа β-адренорецепторов в клетках глиомы С6 на 40%. Данный эффект изопротеренола не был энергозависимым.

Эти результаты дают возможность предполагать, что прогрессивное снижение фармакологических эффектов β-адренергических агонистов при их длительном введении обусловлено снижением числа β-адренорецепторов.

Выраженное влияние на число β-адренорецепторов оказывают антидепрессанты. Имипрамин при его длительном введении крысам уменьшал число β-адренорецепторов в коре головного мозга, а дезметилимипрамин — в сердце.

Под воздействием андрогенов изменяется число β-адренорецепторов и соотношение их подтипов в почках крыс. При гипертрофии почек у мышей, вызванной внутримышечным введением пропионата тестостерона (1 мг/день в течение 21 сут), происходит увеличение числа β-адренорецепторов на единицу белка мембран почек, связывающих ^{125}I-йодцианпиндолол в 2 раза, но не изменяется кажущаяся константа его диссоциации с этими рецепторами ($K_д = 20$ 25 пМ). Изучение влияния β_1-селективных веществ практолола и метопролола и β_2-селективных веществ IPS-339

и зинтерола на связывание этого радиолиганда с мембранами почек позволило установить, что андроген избирательно индуцирует увеличение количества β_2-, но не β_1-адренорецепторов в мембранах клеток почек.

При введении крысам в течение 11 дней ингибитора моноаминоксидазы паргилина (25 мг/кг в сутки) или ингибитора нейронального захвата норадреналина дезметилимипрамина (10 мг/кг 2 раза в сутки) происходит снижение плотности β_1-адренорецепторов в полосатом теле головного мозга на 20–25 %. В то же время адреналэктомия или хроническое введение избирательного антагониста β-адренорецепторов пропранолола вызывали небольшое, но статистически значимое увеличение плотности β-адренорецепторов в полосатом теле. Однако адреналэктомия и указанные ЛВ не влияли заметно на число β-адренорецепторов в полосатом теле.

Адреналэктомия сопровождается снижением числа β-адренорецепторов в жировых клетках крыс, а дексаметазон при его введение крысам вызывает увеличение плотности β-адренорецепторов в лёгких (данный эффект обусловлен синтезом нового белка).

В ряде случаев может изменяться соотношение не только между подтипами β-адренорецепторов, но и между β- и α-адренорецепторами. Так, имеются данные о переходе рецепторов, опосредующих влияние катехоламинов на активность гликогенфосфорилазы и гликогенсинтетазы, в процессе культивирования гепатоцитов крыс с α-типа в β-тип, и об усилении β- но не α-адренергической стимуляции образования цАМФ в гепатоцитах при регенерации печени. Через 36 ч после наложения лигатуры на желчный проток крыс происходит уменьшение числа β_1-адренорецепторов на плазматических мембранах клеток печени с 680 до 285 фмоль/мг белка, но увеличение числа β-адренорецепторов с 25 до 67 фмоль/мг белка. Способность фенилэфрина и изопротеренола стимулировать гликогенфосфорилазу гепатоцитов после холестаза уменьшалась и увеличивалась соответственно. У интактных животных активация этого фермента адреналином ингибировалась фентоламином, но не пропранололом. В то же время при холестазе пропранолол в этом отношении был более активен, чем фентоламин. Поскольку при холестазе имело место 10-кратное увеличение числа митозов в печени и включения ^{3}H-тимидина в ДНК гепатоцитов, можно полагать, что изменения адренергической регуляции гликогенолиза в печени при холестазе не обусловлены изменением гормональных эффектов вследствие нарушения их метаболизма при данной печёночной патологии, а могут быть связаны с регенерационными процессами.

Таким образом, на основании приведённых результатов можно заключить, что причинами вариабельности β-адренорецепторов могут быть:

1) воздействие физиологически активных веществ, так или иначе влияющих на адренергические системы;

2) изменение гормонального фона;

3) изменение функционального состояния органа в условиях патологии (холестаз, регенерация и др.).

Мы считаем необходимым также отметить, что адренергическая регуляция функции тех или иных органов может изменяться не только за счёт изменения числа или соотношения адренорецепторов, но и вследствие индукции изменения каких-то процессов сопряжения рецепторов с внутриклеточными структурами. Иллюстрацией этого положения служат данные о том, что после внутрибрюшинного введения морским свинкам резерпина (0,1 мг/кг в сутки) в течение 3–7 дней происходит значительное увеличение способности изопреналина повышать силу сокращений изолированных сосочковых мышц сердца. Поскольку изопреналин не влиял на положительное инотропное действие гистамина и Ca^{2+} на сосочковые мышцы, то можно считать, что данное повышение чувствительности мышц к изопреналину

является специфичным и опосредованным β-адренорецепторами. Мембраны мышцы желудочков сердца интактных морских свинок и тех животных, которым предварительно вводили резерпин, связывали ^{3}H-дигидроалпренолол с одинаковой константой диссоциации и содержали одинаковое число связывающих участков. Резерпин не влиял также на способность изопреналина вытеснять ^{3}H-дигидроалпренолол из его связи с β-адренорецепторами мембран мышцы желудочков сердца. Следовательно, связывающая способность β-адренорецепторов и их число не играют роль в индукции резерпином повышенной чувствительности сосочковых мышц сердца морских свинок к инотропному эффекту изопреналина, а опосредованы какими-то ещё неизученными механизмами.

Можно предположить, что некоторые факторы влияют на сопряжение адренорецепторов с аденилатциклазой и таким образом изменяют ответ клетки на воздействие катехоламинергических агонистов. Действительно, имеются сведения о том, что при ряде воздействий может изменяться образование комплекса медиатор — рецептор — гуаниновые нуклеотиды (МРГ), играющего ключевую роль в сопряжении β-адренорецепторов с аденилатциклазой. Так, воздействие агонистов (десенситизация), гипотиреоз, солюбилизации рецепторов сопровождаются уменьшением образования комплекса МРГ, а воздействие кортикостероидов, гипертиреоз и повышение вязкости мембран — увеличением образования комплекса МРГ.

Закончив рассмотрение фармакологических и биохимических исследований эффектов катехоламинергических соединений, опосредуемых постсинаптическими β-адренорецепторами, приводим обобщение имеющихся сведений об этих эффектах.

1. β_1-Адренорецепторы сердца (положительный инотропный и хронотропный эффект).
2. β_1-Адренорецепторы адипоцитов (липолиз).
3. β_1-Адренорецепторы юкстагломерулярного аппарата почек (увеличение секреции ренина).
4. β_1-Адренорецепторы неисчерченных мышц сосудов и других органов (расслабление).
5. β_2-Адренорецепторы щитовидной железы (стимуляция секреции йодосодержащих гормонов).
6. β_2-Адренорецепторы скелетных мышц (распад гликогена, стимуляция сокращений).
7. β_2-Адренорецепторы адипоцитов (липолиз).
8. β_2-Адренорецепторы слёзной железы (стимуляция секреции).
9. β_2-Адренорецепторы клеток Лейдига (стимуляция стероидогенеза).
10. β_2-Адренорецепторы гепатоцитов (стимуляция гликогенолиза).
11. β_3-Адренорецепторы адипоцитов (регуляция образования макроэргов и термогенеза).

До сих пор речь шла о постсинаптических β-адренорецепторах, однако необходимо отметить, что в периферических нервных окончаниях найдены пресинаптические β-адренорецепторы, опосредующие высвобождение норадреналина. Их присутствие показано в окончаниях норадренергических нервных волокон, подходящих ко многим внутренним органам животных и человека.

В ЦНС пресинаптических β-рецепторов пока не выявлено, хотя попытки идентифицировать имели место.

Как и постсинаптические β-адренорецепторы, пресинаптические β-адренорецепторы стереоспецифичны, так как (+)-изопротеренол в отличие от (−)-изопротеренола не стимулирует высвобождение норадреналина.

Имеющиеся экспериментальные данные противоречивы в отношении того, к какому подтипу относятся пресинаптические β-адренорецепторы. С одной стороны,

β_2-агонисты тербуталин и салбутамол, но не β_1-агонист H110/38 увеличивают высвобождение ^{3}H-норадреналина из сосудосуживающих нервов человека при их электрической стимуляции; с другой стороны, пресинаптические β-адренорецепторы икроножной мышцы кошек ингибируются избирательным β_1-адреноблокатором метопрололом. Эти результаты могут отражать видовые и/или тканевые различия β-адренорецепторов. В будущем необходимы дальнейшие эксперименты для выяснения идентичности или неидентичности пресинаптических β-адренорецепторов с классическими постсинаптическими β-адренорецепторами.

β-Адренорецепторы являются мембраносвязанными структурами. Поэтому выделение их в чистом виде, необходимое для последующего изучения молекулярной природы, представляет собой сложную задачу, к решению которой удалось приступить лишь в последние годы благодаря развитию биохимических препаративных методов (аффинная хроматография, различные виды электрофореза), применению иммобилизованных катехоламинов и моноклональных антител, а также благодаря синтезу антагонистов β-адренорецепторов, содержащих в своей структуре радиоактивную и фотоаффинную метки (последняя под действием ультрафиолетовых лучей ковалентно связывается с биомолекулами).

Показано, что β-адренергический антагонист *п*-азидобензол-^{125}I-йодкаразолол связывается с β_1- и β_2-адренорецепторами мембран эритроцитов индюка и лягушки насыщаемым образом и с высоким сродством ($K_д$ = 10–15 нМ). Агонисты и антагонисты β-адренорецепторов конкурировали с ними за связывание с этими мембранами. Фотолиз мембранных образцов в присутствии данного антагониста с двойной меткой приводил к ковалентному включению лиганда в мембранные белки, которые в дальнейшем определяли с помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и авторадиографии. β-Адренергические агонисты и антагонисты защищали мембраны от ковалентной метки. Авторы обнаружили, что белки, ковалентно связывающие этот лиганд, представляют собой: в эритроцитах индюка в 100% случаев β_2-адренорецепторы с молекулярной массой 58 000, в ретикулоцитах крыс в 100% встречаются β_2-адренорецепторы (M_r = 65 000, 53 000), в клетках лёгких крыс в 80% находятся β_2-адренорецепторы и 20% — β_1-адренорецепторы (M_r = 62 000, 47 000, 36 000) и в клетках лёгких кролика в 20% — β_2-адренорецепторы и 80% — β_1-адренорецепторы (M_r = 65 000, 55 000).

Солюбилизированные дигитонином β_2-адренорецепторы лёгких собак имели радиус Стокса, равный 4,9 нм и молекулярную массу около 52 000. Такую же молекулярную массу имели β_2-адренорецепторы, фото-аффинно меченные ^{3}H-ацебутололазидом. Рецепторный белок содержит участок связывания гормона. Нативный β_2-адренорецептор, солюбилизированный дигитонином, может состоять более чем из одного такого белка.

Отметим, что общей характеристикой всех агонистов и антагонистов β-адренорецепторов является присутствие в их структуре аминной и гидроксильной групп. У агонистов все заместители являются гидрофильными, что свидетельствует об их взаимодействии с участками, расположенными на поверхности рецепторного белка. У антагонистов присутствуют гидрофобные заместители, которые, по-видимому, проникают в область рецептора, недоступную для гидрофильных заместителей.

Поскольку дитиолы в отличие от монотиолов снижают связывание ^{3}H-дигидроалпренолола с β_2-адренорецепторами мембран микросом скелетных мышц кролика, а H_2O_2 частично обращает этот эффект веществ с двумя сульфгидрильными группами, следует считать, что β-адренорецепторы скелетных мышц содержат в своём составе дисульфидную группу.

В связывании пропранолола с β-адренорецепторами мембран эритроцитов лягушки принимает участие триптофановый остаток. Пропранолол защищает трип-

тофановый остаток β-адренорецепторов от модификации его реагентом Кошланда (бромид 2-окси-5-нитробензола) и уменьшает интенсивность собственной флюоресценции триптофанового остатка. Оценка с помощью уравнения Ферстера расстояния между хромофорными центрами пропранолола и триптофанового остатка показала, что оно меньше 20 нм. По-видимому, гидрофобный «карман», содержащий данный триптофановый остаток, имеет большое значение в связывании антагонистов, но не агонистов β-адренорецепторов.

Трансмембранные домены различных адренорецепторов имеют сходные участки аминокислотных последовательностей. Так, α- и β-адренорецепторы сходны между собой на 40%. Большее сходство в строении имеют отдельные подтипы адренорецепторов (подтипы α_1-АР и α_2-АР сходны между собой на 75%). Аминокислотные последовательности трансмембранных доменов, связывающих эндогенные катехоламины, сходны на 60% для всех трёх подтипов β-адренорецепторов.

Различные области рецептора функционально гетерогенны: выделены зоны, ответственные за взаимодействие рецептора с адренергическими веществами (в дальнейшем — адренергические лиганды или просто лиганды) и G-белками.

В то же время замена отдельных аминокислот в трансмембранных гидрофобных доменах оказывает на него существенное влияние (например, замена аспарагиновой аминокислоты под номером 113 (Asp^{113}) в 3-м гидрофобном домене приводит к резкому снижению связывающей способности β_2-адренорецептором как в отношении агонистов, так и антагонистов).

Аналогичные эксперименты с другими аминокислотами трансмембранных участков белковой цепочки рецептора позволили высказать предположение о важной роли отдельных аминокислот в его взаимодействии с катехоламинами. Одной из наиболее изученных в этом плане является структура β_2-адренорецептора, имеющая много общего со структурой других типов адренорецепторов.

В формировании лигандсвязывающего участка β-АР участвуют боковые цепи нескольких аминокислот из трансмембранных доменов рецептора, лежащих в его гидрофобной части внутри фосфолипидного бислоя клеточной мембраны. Среди них аспарагиновая аминокислота под номером 113 (Asp^{113}), находящаяся в 3-м трансмембранном гидрофобном домене и имеющая в своём составе несущую отрицательный заряд карбоксильную группу, с которой благодаря электростатическому (ионному) взаимодействию связывается положительно заряженная протонированная аминогруппа катехоламина.

Гидроксилы катехолового кольца молекулы лиганда образуют водородные связи с гидроксильными группами двух молекул серина под номерами 204 и 207 (Ser^{204} и Ser^{207}), находящимися в 5-м трансмембранном домене. Кроме того, катехоловое кольцо лиганда может вступать в гидрофобное взаимодействие с гидрофобным ароматическим кольцом аминокислоты фенилаланина под номером 290 (Phe^{290}), находящейся в 6-м трансмембранном домене.

Нахождение лигандсвязывающего участка рецептора внутри фосфолипидного бислоя клеточной мембраны объясняет, почему гидрфобные β-адреноблокаторы связываются более прочно, чем эндогенные гидрофильные катехоламины.

Другим функционально значимым центром β-АР является область взаимодействия с G-белками, регулирующими активность эффекторных систем ферментов и ионных каналов (для всех подтипов β-АР–аденилатциклазы). Связывание адренорецептора с G-белками происходит со стороны внутренней поверхности плазматической мембраны в месте нахождения самой большой 3-й внутриклеточной петли адренорецептора. Для связывания с G-белками и активации аденилатциклазы абсолютно необходима область петли, состоящая из 8 аминокислот (остатки 222–229) и образующая связь между карбоксильным концом 5-й трансмембранной спирали

и 3-й внутриклеточной петлёй. Все рецепторы, связывающие катехоламины, содержат Asp в позиции, аналогичной Asp^{113} в третьем трансмембранном домене β-адренорецептора, два Ser в 5-м трансмембранном домене и Phe — в 6-м, различия касаются в основном порядкового номера аминокислот в полипептидной цепи рецептора, участвующих в формировании его активного центра.

Помимо обязательных для связывания катехоламинергических лигандов аминокислот полипептидная цепочка адренорецепторов содержит и другие аминокислотные остатки (аспарагина, тирозина, треонина, триптофана, цистеина и др.) определяющие особенности взаимодействия рцептора с различными адренергическими агонистами и антагонистами.

Важнейшую роль в изменении функционально-биохимических процессов в клетках при действии катехоламинов и родственных им соединений (агонистов) на адренорецепторы играют G-белки. Именно G-белки осуществляют трансдукцию (передачу) адренергического сигнала с адренорецептора на эффекторные (реализующие эффект) ферменты и ионные каналы. G-белки являются гетеротримерами и состоят из 3 субъединиц (α, β, γ). Важнейшую роль из них играет α-субъединица, которая обеспечивает связывание с рецептором и присоединяет ГТФ. На α-субъединице расположен участок, который может связывать либо ГТФ (гуанозинтрифосфат), либо ГДФ (гуанозиндифосфат).

Взаимодействие активированного адренергическими лигандами рецептора с G-белками в составе комплекса АР — G-белок — эффекторный фермент (или ионный канал) активирует последние с дальнейшими функционально-биохимическими изменениями в клетках.

В невозбуждённом состоянии α-субъединица G-белка связана с молекулой ГДФ.

Взаимодействие адренергического лиганда с ответственными за связывание трансмембранными доменами приводит к изменению конформации 3-го петлевого домена, что сопровождается изменением свойств α-субъединицы G-белка — последняя теряет сродство к ГДФ и связывается с молекулой ГТФ. Связывание ГТФ с α-субъединицей G-белка приводит к его отщеплению от рецептора и диссоциации на α- и прочно связанные между собой $\beta\gamma$-субъединицы. После диссоциации активированная ГТФ α-субъединица и комплекс $\beta\gamma$-субъединиц G-белка действуют на различные эффекторные системы (ферменты и ионные каналы), что далее через систему вторичных мессенджеров (посредников) изменяет внутриклеточные процессы.

Если объектом регуляции G-белков является аденилатциклаза (например, для всех подтипов β-АР), то при её активации в клетке из АТФ синтезируется цАМФ — вторичный мессенджер, запускающий процессы, лежащие в основе активации клетки.

Существует несколько основных типов G-белков: стимулирующие (G_s) и ингибирующие (G_i) аденилатциклазу, активирующие фосфолипазы (G_q), влияющие на ионные каналы (G_o). Каждый основной подтип адренорецептора отдаёт предпочтение специфическому классу G-белков: α_1-АР — G_q, α_2-АР — $G_{i/o}$, β-АР — G_s.

Объектом регуляции G-белков помимо аденилатциклазы, могут быть и другие ферментативные белки — гуанилатциклаза, фосфолипаза С, фосфолипаза A_2, ионные каналы (K^+ и Ca^+) и др. Так как α-субъединица обладает внутренней ГТФ-азной активностью, то в последующем происходит гидролиз связанного с α-субъединицей ГТФ с образованием ГДФ и P_i и реассоциацией α-субъединицы с $\beta\gamma$-субъединицами. В конечном итоге α-субъединица отщепляется от эффекторного фермента и присоединяется к рецептору. Система приходит в исходное состояние.

Для каждого из подтипов адренорецепторов существует определённый механизм трансформации химического сигнала в биологическую реакцию клетки, который реализуется при связывания с рецептором соответствующего адренергического аго-

ниста. Так, основным механизмом, ответственным за работу α_1-АР, является активация G-белками (G_q-белок) фосфолипазы С, которая гидролизует мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат до инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3, ИТФ) и диацилглицерина (ДАГ). IP_3, связываясь со специфичными Ca^{2+}-каналами эндоплазматического ретикулума вызывает высвобождение из него Ca^{2+}, что приводит к повышению содержания Ca^{2+} в цитоплазме и активирует кальцийзависимые процессы — сокращение гладких мышц и секрецию желёз. Под влиянием ДАГ в присутствии кальция активируется протеинкиназа С. В желудочно-кишечном тракте стимуляция α_1-АР и увеличение содержания Ca^{2+} в клетках, наоборот, вызывают расслабление гладких мышц из-за гиперполяризации, развивающейся при открывании зависимых от кальция калиевых каналов (Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов).

Активация каждого из подтипов β-адренорецепторов — β_1, β_2 и β_3 приводит к возрастанию опосредованной через G_s-белок активности аденилатциклазы, повышению уровня цАМФ, последующей активации цАМФ-зависимой протеинкиназы (протеинкиназа А), которая за счёт фосфорилирования различных белков, в частности ферментативных, изменяет функционально-метаболические процессы в клетке.

Молекулярные механизмы, вовлечённые в реализацию физиологических эффектов катехоламинов, опосредованных β-адренорецепторами, исследованы достаточно полно.

В экспериментах, проведённых на эритроцитах различных видов животных, клетках сердца, лёгких и некоторых культурах клеток (лимфома S49, глиома С6), было продемонстрировано существования сопряжения между β_1- и β_2-адренорецепторами с аденилатциклазой. В данном сопряжении, проявляющемся в активации аденилатциклазы, принимают участие гуаниновые нуклеотиды и регуляторный белок, связывающий эти нуклеотиды.

По современным представлениям при связывании агониста (Н) с β-адренорецепторами (R) образуется комплекс (Н–R).

Взаимодействуя с белком, связывающим гуаниновые нуклеотиды (N), агонист образует тройной комплекс (Н·R·N). В результате этого взаимодействия происходит снижение сродства белка, связывающего гуаниновые нуклеотиды, к ГДФ. При этом ГДФ высвобождается и его место занимает ГТФ, который придаёт белку, связывающему гуаниновые нуклеотиды, заряд, вследствие чего уменьшается сродство β-адренорецептора к агонисту и агонист-рецепторный комплекс распадается. Кроме того, белка с каталитической субъединицей аденилатциклазы (К) и образование активного фермента комплекса ($N^{ГТФ}$-К). После гидролиза ГТФ в ГДФ, происходящего при участии ГТФазы, данный комплекс быстро распадается и аденилатциклаза становится неактивной. Согласно этой схеме, высвобождение ГДФ из его связи с белком является лимитирующим этапом активации аденилатциклазы.

С помощью видеоинтенсификационной микроскопии показано, что β-адренорецепторы изолированных гепатоцитов человека в комплексе с флюоресцентным аналогом алпренолола существуют в кластерах как при 4 °С, так и при 37 °С. Кластеры наблюдались уже через 30 с после добавления лиганда, что позволяет предполагать их существование в отсутствии антагониста. Преинкубация клеток с изопротеренолом в течение 5–30 мин приводила к высвобождению β-адренорецепторов из кластеров и их гомогенному распределению по мембране (коэффициент латеральной диффузии был равен $1{,}4 \cdot 10^{-9}$ см$^2 \cdot$ с$^{-1}$). Зависимость высвобождения рецепторов из кластеров коррелировала с потерей чувствительности аденилатциклазы к β-агонистам, но высвобождение происходило значительно медленнее активации аденилатциклазы. Результаты этой работы свидетельствуют, что активация аденилатциклазы через

адренорецепторы не требует латеральной подвижности большинства адрено-рецепторов.

Важные сведения о механизмах функционирования β-адренорецепторов можно получить с помощью реконструкции функциональной взаимосвязи между β-адренорецепторами, солюбилизированными из мембран эритроцитов индюка, с ГТФ-связывающим белком аденилатциклазы (N-белок), выделенным из мембран печени кролика. Этот белок был способен встраиваться в протеолипосомы, содержащие β-адренорецепторы. В присутствии изопротеренола N-белок быстро активировался ГТФ и восстанавливал активность аденилатциклазы в мембранах клеток. Стимуляция была пропорциональна концентрации протеолипосом. Рассчитано, что один β-адренорецептор способен активировать 5–6 N-белков. По-видимому, β-адренорецептор осуществляет своего рода катализ в аденилатциклазной системе.

Все β-адренорецепторы, стимулирующие аденилатциклазу, сопряжены с G_s-белком. Этот белок может также передавать активирующее влияние на кальциевые каналы мембран скелетных или сердечной мышц. Почти во всех случаях эффекты, опосредованные активацией β_1- и β_2-адренорецепторов, связывают с повышением внутриклеточного уровня цАМФ, обусловленного увеличением активности аденилатциклазы. В ряде экспериментов было выявлено, что активация аденилатциклазы NaF не воспроизводит все эффекты, наблюдающиеся при стимуляции β-адренорецепторов. В качестве примера можно привести индукцию агонистами β-адренорецепторов ингибирования поглощения Mg^{2+} клетками лимфомы S49, стимуляции метилирования фосфолипидов в эритроцитах и клетках астроцитомы и изменение ионных трансмембранных токов; изадрин вызывает рост тока Ca^{2+}, а β-адреноблокаторы его ингибируют. Теоретически это не кажется удивительным, поскольку изменение конформации β-адренорецепторов при воздействии на них агонистов может приводить к изменению активности не только аденилатциклазы, но и функции других мембранных структур, с которыми контактируют данные рецепторы. Однако вследствие того, что изменение уровня цАМФ в клетке влияет на многие важнейшие клеточные функции, катехоламинчувствительная аденилатциклаза, по-видимому, принимает участие в реализации биологической активности адренергических средств. В то же время отметим, что пока нет ясности в вопросе, существуют ли различия в механизмах сопряжения β_1- и β_2-адренорецепторов с аденилатциклазой, но известно, что β_2-адренорецепторы клеток глиомы С6 лучше сопряжены с аденилатциклазой, чем β_1-адренорецепторы.

Как и в случае постсинаптических β-адренорецепторов, стимуляция пресинаптических β-адренорецепторов может приводить к изменению уровня цАМФ. Считается, что облегчение высвобождения медиатора, вызываемое стимуляцией пресинаптических β-адренорецепторов, опосредовано повышением содержания цАМФ в норадренергических нервных окончаниях. Изложенная точка зрения подтверждается данными о том, что дибутирил-цАМФ и теофиллин, увеличивающие внутриклеточный уровень цАМФ, повышают высвобождение норадреналина в семявыводящем протоке морской свинки, вызываемое раздражением нерва. Папаверин, как и другие ингибиторы фосфодиэстеразы, усиливает высвобождение норадреналина при раздражении симпатических нервов.

Положительная обратная связь, облегчающая высвобождение медиатора из адренергических нейронов, по-видимому, играет немаловажную роль в возникновении гипертензии при стрессовом подъёме уровня адреналина в крови. Это предположение основано на том, что, во-первых, циркулирующий адреналин непосредственно может стимулировать пресинаптические β-адренорецепторы, во-вторых, он может накапливаться в симпатических нервных окончаниях и, высвобождаясь их них, в последующем опять стимулировать эти же рецепторы, тем самым усиливая выброс

катехоламинов. Если это действительно так, то β-адреноблокаторы, такие как пропранолол, будут ингибировать данный эффект адреналина и уменьшать опасность возникновения гипертензии при стрессе. По нашему мнению, такой возможный эффект действия β-адреноблокаторов нельзя оставлять без внимания.

Десенситизация β-адренорецепторов. Известно, что при инкубации агонистов с клетками, содержащими β-адренорецепторы, в течение 15–30 мин развивается десенситизация рецепторов. Десенситизация сопровождается снижением числа β-адренорецепторов и способности агонистов активировать аденилатциклазу. Изопротеренол снижает число β-адренорецепторов в мембранах клеток коры головного мозга, жировой ткани и предстательной железы.

Процесс десенситизации β-адренорецепторов зависит от степени дифференцировки ткани. Изопротеренол повышает концентрацию цАМФ в недифференцированных (с низкой плотностью) и дифференцированных (с высокой плотностью) мышечных клетках линии L_6E_9. К данному эффекту изопротеренола у клеток с низкой плотностью десенситизация развивается в 2 раза быстрее, чем у клеток с высокой плотностью. У десенситизированных клеток с высокой плотностью сохраняется, а у десенситизированных клеток с низкой плотностью исчезает активность изопротеренолзависимой аденилатциклазы. При десенситизации число β-адренорецепторов, определяемое по связыванию ^{125}I-йодцианпиндолола, не изменяется у клеток с низкой плотностью, но уменьшается у клеток с высокой плотностью.

При изучении молекулярных механизмов десенситизации β-адренорецепторов были открыты новые важные факты о путях обмена рецепторных молекул в клетках [9–12].

Определяемые по связыванию ^{125}I-цианпиндолола β-адренорецепторы плазматических мембран эритроцитов лягушки исчезают в процессе инкубации эритроцитов с агонистами β-адренорецепторов. Эти рецепторы обнаруживаются в лёгкой везикулярной фракции, получаемой при центрифугировании цитозоля эритроцитов при 158 000 g в течение 1 ч. Активность маркерных ферментов плазматических мембран фтор- и форсколинстимулируемой аденилатциклазы, 5′-нуклеотидазы и ацетилхолинэстеразы в этой везикулярной фракции была незначительной. Гуаниновые нуклеотиды не влияли на связывание агонистов и антагонистов β-адренорецепторов с данными везикулами. С помощью фотоаффинной метки ^{125}I-пазидобензилкаразолола выявлено, что β-адренорецепторы плазматических мембран и везикул имеют одинаковые электрофоретические свойства. Авторы делают вывод, что индуцируемая катехоламинами десенситизация β-адренорецепторв эритроцитов приводит к интернализации (проникновению внутрь клеток) более 50% рецепторов плазматических мембран в цитозольные везикулы, не содержащие аденилатциклазной системы. Особый интерес представляют исследования, посвящённые изучению механизмов процессов десенситизации β-адренорецепторов. Так как ингибиторы фосфолипазы A_2 и трансглутаминазы блокируют десенситизацию адренорецепторов, становится понятной возможность многих гормональных воздействий, влияющих на активность этих ферментов, изменять также и чувствительность клеток к β-адренергическим стимулам. При инкубации предстательной железы крыс с изопротеренолом зарегистрировано уменьшение количества β-адренорецепторов, связывающих ^{3}H-дигидроалпренолол, с 290 до 167 фмоль/мг белка и снижение способности изопротеренола стимулировать аденилатциклазу. Предварительная инкубация ткани предстательной железы с ацетилхолином (100 мкМ), KCl (56 мМ) или кальциевым ионофором А 13287 (10 мкМ) предотвращала индукцию изопротеренолом десенситизации аденилатциклазы, но не снижения числа β-адренорецепторов. ГТФ терял способность увеличивать чувствительность аденилатциклазы после её десенситизации, вызванной изопротеренолом, что может быть связано с нарушением функции нуклеотидсвязы-

вающего регуляторного белка, обеспечивающего сопряжение между β-адренорецепторами и аденилатциклазой. Ацетилхолин предотвращал потерю способности ГТФ увеличивать стимулирующее действие изопротеренола на аденилатциклазу. Более того, при десенситизации имело место снижение способности ГФФ(NH)Ф и NaF стимулировать аденилатциклазу, а при предварительной инкубации предстательной железы с ацетилхолином снижение этой способности у ГФФ(NH)Ф и NaF не наступало.

В связи с этим, несмотря на уменьшение числа β-адренорецепторов при десенситизации, остающиеся рецепторы могут передавать сигнал катехоламинов на аденилатциклазу при условии защиты нуклеотидсвязывающего регуляторного компонента (белка) в процессе десенситизации. Эта защита может обеспечиваться увеличением внутриклеточного уровня Ca^{2+}, вызываемого такими веществами, как ацетилхолин, А 13287 или KCl. Таким образом, нарушение регуляторного белка, связывающего гуаниновые нуклеотиды, является одним из главных факторов развития десенситизации катехоламинчувствительной аденилатциклазы.

Эти исследователи ещё раз продемонстрировали, что изучение только связывания агонистов или антагонистов с рецепторами не даёт права говорить об их биологической активности, поскольку для реализации указанной активности необходимо существование сопряжения между данными рецепторами и какими-либо функциональными изменениями клеток. В связи с этим, по нашему мнению, открывается ещё один путь регуляции адренореактивных систем — воздействие на компоненты, трансформирующие и передающие сигналы, полученные рецептором в момент его взаимодействия со специфическими лигандами, на другие биоструктуры клеток.

В развитии клеточной реакции на активацию адренорецепторов могут участвовать и другие механизмы, связанные с G-белками.

При длительной стимуляции β-адренорецепторов может прекратиться и синтез новых молекул рецептора.

Теоретически каждый из процессов, протекающих в ходе функционирования адренореактивных структур, может быть объектом стимулирующего или угнетающего воздействия, но практически в настоящее время наиболее изученным и клинически значимым является влияние лекарственных веществ на следующие адренергические процессы и структуры [9–22]:

1) синаптические и внесинаптические адренорецепторы;
2) высвобождение медиатора из нервного окончания;
3) нейрональный или экстранейрональный захват КА;
4) депонирование и высвобождение КА из синаптических пузырьков;
5) ферментативный распад КА.

4.2. Адреномиметические средства (адреномиметики)

Адреномиметики (адреномиметические средства) — это вещества природного и синтетического происхождения, воспроизводящие полностью или частично в организме животных и человека эффекты эндогенных катехоламинов (КА) — адреналина (А) и норадреналина (НА) за счёт влияния на адренорецепторы (АР), структурные элементы клетки, участвующие в обмене и транспорте эндогенных катехоламинов и др.

Эффекты эндогенных катехоламинов синаптического (НА) и надпочечникового (А) происхождения в организме реализуются с участием адренергических синапсов и входящих в их состав пре- и постсинаптических адренорецепторов, а также внесинаптических адренорецепторов, расположенных вне адренергических синапсов.

В зависимости от особенностей действия на адренорецепторы, адреномиметики можно подразделить на препараты прямого и непрямого (косвенного, опосредованного) типа действия.

Адреномиметики непрямого типа действия (симпатомиметики), влияя на обмен катехоламинов (выброс медиатора, обратный захват, депонирование в синаптических пузырьках и др.), увеличивают концентрацию НА в синаптической щели, повышая тем самым активность адренорецепторов.

Адреномиметики прямого типа действия непосредственно активируют адренорецепторы эффекторных клеток за счёт связывания с ними.

Несколько сложнее классифицировать по типу действия адренергические вещества, влияющие на пресинаптические адренорецепторы, находящиеся в нервных окончаниях (адренергических, холинергических и др.).

Поскольку такие вещества вызывают эффекты за счёт непосредственного взаимодействия с адренорецепторами, то их можно было бы отнести к группе препаратов прямого типа действия. Но с другой стороны, их влияние на функцию органов и тканей обусловлено изменением концентрации медиатора (НА, АХ и др.) в синаптической щели, т. е. их можно определить и как адренергические вещества непрямого типа действия.

При рассмотрении характера адренергических влияний необходимо иметь в виду, что активация адренорецепторов не всегда оказывает адреномиметическое действие на эффекторные клетки. В частности, при активации пресинаптических α_2-адренорецепторов по принципу отрицательной обратной связи регулирующих выброс НА, его выделение в синаптическую щель уменьшается, что может привести к уменьшению адренергических и усилению парасимпатических эффектов (брадикардии, расширению сосудов, учащению мочеиспускания и др.).

Также необходимо учитывать, что в органах находятся рецепторы различных типов, из которых один является преобладающим, именно он в основном и определяет его реакцию на адренергические вещества. Например, из β-адренорецепторов сердца на долю β_1-АР приходится порядка 70% (в предсердиях 60–70%, в желудочках 70–80%), а на долю β_2-АР — 30% (в предсердиях 30–40%, в желудочках — 20–30%). В лёгких, наоборот, на долю β_1-АР приходится примерно 25%, а на долю β_2 — 75%. Поэтому считается, что наиболее эффективное влияние на сердце оказывают агонисты и антагонисты β_1-адренорецепторов, а на лёгкие агонисты и антагонисты β_2-адренорецепторов.

Необходимо помнить, что для ряда веществ тропность (избирательность действия, селективность действия) в отношении того или иного типа адренорецепторов или активность в отношении отдельных процессов, протекающих в адренергическом синапсе, является величиной относительной и может зависеть от дозы. Во многом это связано с тем обстоятельством, что в структуре различных типов адренорецепторов много общего (например, гомологичность активных центров β_1- и β_2-адренорецепторов, где происходит взаимодействие рецептора с лекарственными веществами составляет 71%). Часто принадлежность к определённой группе активаторов (или ингибиторов) адренорецепторов (например, α-, β-, α_1-, β_1-адреномиметиков и др.) определяется величиной дозы препарата, влияющей на свойства рецептора. Если препарат избирательно действует на адренорецептор, например, как ксилометазолин (галазолин) на α_2-АР в более низкой дозе, чем на на α_1-АР, то его относят к группе α_2-адреномиметиков, несмотря на то, что при повышении дозы он начинает возбуждать и α_1-АР.

Следует иметь в виду, что способностью влиять на адренергические синапсы и адренорецепторы обладают разные по областям клинического использования вещества. В классическом понимании этого термина адреномиметиками как лекарственными

средствами следует называть только вещества, которые за счёт взаимодействия с периферическими и центральными адренореактивными структурами регулируют деятельность периферических внутренних органов и применяются в клинике именно для этих целей.

В зависимости от типа действия (прямого или непрямого) и тропности в отношении отдельных видов адренорецепторов адреномиметики можно классифицировать следующим образом.

I. Адренергические вещества прямого типа действия (адреномиметики прямого типа действия, адреностимуляторы):

1) вещества, активирующие α- и β-адренорецепторы (α- и β-адреномиметики);

2) вещества, активирующие преимущественно α-адренорецепторы (α-адреномиметики);

3) вещества, активирующие преимущественно β-адренорецепторы (β-адреномиметики).

II. Адренергические вещества непрямого типа действия (адреномиметики непрямого типа действия):

1) симпатомиметики;

2) адренергические вещества, преимущественно, угнетающие нейрональный или экстранейрональный захват катехоламинов;

3) адренергические вещества, преимущественно угнетающие ферментативный распад катехоламинов.

4.2.1. Адренергические вещества прямого типа действия (адреномиметики прямого типа действия, адреностимуляторы). Адреномиметики прямого типа действия (адреностимуляторы) различаются по специфичности действия на отдельные типы и подтипы адренорецепторов.

Наиболее известными из данной группы веществ являются фенилалкиламины — адреналин, норадреналин, изадрин и фенилэфрин (мезатон), а также производные имидазолина.

Из производных фенилалкиламина первые 3 являются катехоламинами (катехол — соединение, содержащее две ОН-группы в 3-м и 4-м положении бензольного кольца, другое название *о*-диоксибензол), а фенилэфрин, содержащий в бензольном кольце один гидроксил, таковым не является.

1. Вещества, активирующие α- и β-адренорецепторы (α- и β-адреномиметики). Из перечисленных выше соединений наиболее многообразным действием на организм обладают природные катехоламины — адреналин и, несколько в меньшей степени, норадреналин.

Многообразие эффектов адреналина связано с его способностью возбуждать все типы адренорецепторы — α_1, α_2, β_1, β_2, в отличие от норадреналина, действующего преимущественно на α-адренорецепторы (α_1, α_2, β_1), фенилэфрина, возбуждающего только α-адренорецепторы (в основном α_1) и изадрина, избирательно активирующего только β-адренорецепторы.

Адреналин. Из всех адреномиметиков наибольшее сходство с эффектами, вызываемыми возбуждением симпатической нервной системы, даёт введение в организм адреналина.

Действие адреналина затрагивает практически все функции организма, поэтому ограничимся рассмотрением только основных клинически значимых эффектов.

Адреналин приблизительно одинаково действует на α_1-, α_2- и β_1-адренорецепторы. По сравнению с другими подтипами адренорецепторов более чувствительны к нему β_2-АР.

Так как адреналин возбуждает как α-, так и β-АР, то его влияние на тонус сосудов во многом определяется характером распределения адренорецепторов в тех или иных сосудистых областях. В основном действие адреналина распространяется на артериолы и прекапиллярные сфинктеры.

Сосуды кожи, слизистых оболочек, органов брюшной полости, почек, венозного русла (в них преобладают сосудосуживающие α-адренорецепторы) под влиянием адреналина суживаются, а сосуды сердца, головного мозга и, особенно, скелетных мышц (в них преобладают сосудорасширяющие β_2-адренорецепторы) расширяются.

Такой характер перераспределения кровотока (снижение кожного, усиление мышечного и коронарного кровотока) способствует сохранению тепла и усилению за счёт обеднения одних органов кровоснабжения таких жизненно важных органов, как сердце и мозг, что важно для мобилизации организма в экстремальных ситуациях.

Адреналин повышает систолическое давление за счёт положительного инотропного и хронотропного действия на сердце и сосудосуживающего действия, связанного с влиянием на α_1-АР сосудов. Так как адреналин стимулирует также сосудорасширяющие β_2-АР, то вследствие этого может произойти снижение общего периферического сопротивления и падение диастолического давления.

Действие адреналина на тонус сосудов и артериальное давление зависит от дозы и скорости введения. Если в больших дозах и при большой скорости введения адреналин повышает артериальное давление за счёт стимуляции как α_1-, так и β_2-адренорецепторов сосудов, то в малых дозах при быстром и медленном введении он может вызвать снижение артериального давления из-за большей чувствительности к нему сосудорасширяющих β_2-адренорецепторов по сравнению с сосудосуживающими α_1-адренорецепторами.

Возбуждая β_1-АР кардиомиоцитов и проводящей системы сердца адреналин увеличивает силу сокращений сердца (положительный инотропный эффект), частоту сердечных сокращений (положительный хронотропный эффект), скорость проведения возбуждения в сердце. В высоких дозах адреналин может вызвать аритмию, в том числе желудочковые экстрасистолы, желудочковую тахикардию и фибрилляцию желудочков.

Повышая силу и частоту сердечных сокращений адреналин увеличивает ударный и минутный объём. При этом наблюдается резкое повышение потребления кислорода сердцем, что в случае его недостатка может привести к повреждению кардиомиоцитов.

Кроме того, адреналин, действуя на β_2-АР бронхов, расслабляет бронхи, действуя на α- и β-АР, снижает тонус гладких мышц кишечника, но действуя на α_1-АР, увеличивает тонус сфинктеров желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря, действуя на α_1-АР, вызывает сокращение матки, а на β_2-АР — расслабление матки (последнее в норме преобладает).

Метаболизм. Действие адреналина на метаболические процессы в клетках реализуется в основном за счёт активации β-адренорецепторов.

Так, стимулируя β_2-АР в печени адреналин усиливает процесс гликолиза, что приводит к снижению содержание гликогена в печени, повышению в крови содержания глюкозы, молочной кислоты.

За счёт влияния на на все подтипы β-адренорецепторов клеток жировой ткани, адреналин активирует липолиз и вызывает увеличение содержания в крови свободных жирных кислот.

Обменные процессы в организме адреналин может регулировать за счёт влияния на выделение гормонов эндокринными железами. Так, стимулируя β_2-АР и α_2-АР поджелудочной железы адреналин соответственно может увеличивать и уменьшать

выработку инсулина (последний эффект преобладает). За счёт активации β-АР α-клеток поджелудочной железы адреналин повышает секрецию глюкагона.

Адреналин эффективен только при парентеральном введении из-за быстрого разрушения с участием КОМТ и МАО и конъюгации в клетках слизистой оболочки кишечника и в печени.

При внутривенном введении адреналин и другие катехоламины действуют только несколько минут за счёт быстрого нейронального и экстранейронального захвата и метаболизма.

Адреналин плохо проникает через гематоэнцефалический барьер.

Основные фармакологические реакции в зависимости от пути введения (внутримышечно, под кожу) продолжаются от 5 до 30 мин.

Адреналин применяют для устранения внезапно возникшей остановки сердца (вводят интракардиально с помощью длинной иглы в полость сердца 0,5–0,7 мл ампульного раствора, лучше развести в 8–10 мл физиологического раствора); для купирования аллергических реакций, устранения приступов бронхиальной астмы в качестве средства скорой помощи; для вывода больных из гипогликемической комы; добавляют к растворам местных анестетиков при терминальной анестезии для удлинения продолжительности их действия.

Как и адреналин, норадреналин активирует α_1-, α_2- и β_1-адренорецепторы, но значительно слабее влияет на β_2-АР, в связи с чем его иногда относят к α-адреномиметикам. Возбуждающее действие норадреналина на α_1-адренорецепторы выражено сильнее, чем у адреналина. По спектру клинического использования он ближе к α-адреномиметикам, чем адреналин. Тем не менее, в связи с наличием выраженной β_1-адреномиметической активности и способности, в отличие от α-адреномиметиков, оказывать прямое влияние на работу сердца его целесообразнее рассматривать в группе неспецифических стимуляторов α- и β-адренорецепторов.

Стимулируя β_1-АР сердца, норадреналин увеличивает сократительную способность сердца и ударный объём. Как и адреналин, норадреналин увеличивает коронарный кровоток. Действие норадреналина не приводит к возрастанию минутного объёма (сердечного выброса). Частота сердечных сокращений под влиянием НА может даже уменьшиться. Это связано с выраженным возбуждающим действием НА на α_1-АР сосудов (артериол и вен), что приводит к их сужению и повышению АД. В ответ на быстрое повышение АД рефлекторно, с механорецепторов сосудов через систему блуждающих нервов и активацию М-ХР сердца, возникает брадикардия и ритм сердечных сокращений урежается, несмотря на наличие у НА прямого стимулирующего действия на β_1-адренорецепторы сердца.

Сужение артериол приводит к уменьшению кровотока в почках, печени, органах ЖКТ под влиянием норадреналина. Уменьшение кровотока в почках может привести к почечной недостаточности, что ограничивает его применение у больных с выраженной артериальной гипотензией.

Так как норадреналин практически не влияет на сосудорасширяющие β_2-АР, то в отличие от адреналина он оказывает только сосудосуживающее действие, не зависящее от дозы или скорости введения, поэтому он в большей степени, чем адреналин повышает периферическое сосудистое сопротивление и наряду с систолическим повышает диастолическое артериальное давление.

На гладкие мышцы внутренних органов, обмен веществ норадреналин оказывает однонаправленное действие с адреналином, но по силе воздействия ему значительно уступает.

Вводят его обычно в вену с помощью капельницы непрерывно для поддержания стабильной концентрации в крови, так как он быстро инактивируется.

Норадреналин применяют для повышения артериального давления при его значительном падении при травмах, отравлениях и т. п. При длительном и чрезмерном назначении из-за снижения кровотока может развиться почечная и кишечная ишемия, вплоть до развития в почках почечной недостаточности. При подкожном введении из-за сосудосуживающего эффекта возможно развитие некроза.

Лекарственными средствами, стимулирующими как α-, так и β-адренорецепторы являются также адреномиметики непрямого типа действия (симпатомиметики) фармакологическая активность и клиническое применение которых во многом аналогичны прямым α- и β-адреномиметикам. Механизм действия и особенности их практического использования будут рассмотрены ниже в разделе «Адреномиметики непрямого типа действия (симпатомиметики)».

2. *Вещества, активирующие преимущественно α-адренорецепторы (α-адреномиметики).* К данной группе препаратов относятся соединения, которые с той или иной степенью избирательности активируют α_1- и α_2-адренорецепторы, не оказывая при этом влияния на β-адренорецепторы.

Их классификация по специфичности действия на отдельные подтипы α-адренорецепторов (α-, α_1- и α_2-адреномиметики) довольно условна. Часть из этих препаратов влияет в основном на α_1-АР. Другие могут действовать на α-адренорецепторы обоих типов, но выраженность активирующего действия на отдельные подтипы α-адренорецепторов (α_1- и α_2-АР) отличается. Различие может носить дозозависимый характер. Так, ксилометазолин (галазолин) в низких концентрациях действует на α_2-АР, в высоких концентрациях активирует α_1-АР.

Препарат, неспецифически возбуждающий как α_1-, так и α_2-АР, норадреналин в связи с наличием β_1-адреномиметической активности рассматривался ранее в разделе веществ, активирующих α- и β-адренорецепторы.

По фармакодинамике и спектру клинического использования избирательные агонисты α_1-адренорецепторов, в отличие от избирательных агонистов β-адренорецепторов (β_1- и β_2-АР) с характерной для каждого из них областью клинического использования и спектром побочного действия, не имеют существенных преимуществ перед неселективными препаратами.

Клиническое применение α-агонистов, как и других адренергических веществ, целиком базируется на их фармакологических свойствах. Способность агонистов α-АР за счёт сужения периферических сосудов повышать артериальное давление находит применение в лечении гипотоний различного происхождения (коллапс, шок, передозировка ганглиоблокаторов, отравления, инфекции и др.), а при местном нанесении для лечения воспалительных заболеваний слизистых оболочек носа и глаз. Способность ряда α-адреномиметиков (клонидин, гуанфацин и др.) за счёт центрального α_2-адренергического действия снижать артериальное давление используются для лечения гипертонии. Кроме того, α-адреномиметики (мезатон) или адреналин могут применяться для удлинения времени действия и уменьшения токсичности местных анестетиков при проводниковой или терминальной анестезии. Норадреналин при этом, как уже говорилось выше, применять нельзя, так как при подкожном введении он вызывает некротические изменения в тканях.

Избирательным действием на отдельные подтипы α-АР обладают фенилэфрин (мезатон), метоксамин — в основном на α_1-АР и др., ксилометазолин (галазолин), клонидин (клофелин) и др., влияющие в основном на α_2-АР.

Агонисты α_1-адренорецепторов. Агонист α_1-АР фенилэфрин (мезатон) не является катехоламином, так как содержит лишь одну ОН-группу в бензольном кольце, но он относится к фенилалкиламинам.

На сердечно-сосудистую систему фенилэфрин влияет аналогично НА, но действует слабее и продолжительнее (соединения, имеющие только одну ОН-группу в 3-м или 4-м положении, не подвергаются действию КОМТ).

Аналогично адреналину и норадреналину фенилэфрин увеличивает коронарный кровоток. В большинстве органов и скелетных мышцах под влиянием фенилэфрина кровоток снижается.

Особенностью действия фенилэфрина на сосуды является то, что он оказывает сильное сосудосуживающее действие на артерии и слабое на вены. В связи с этим фенилэфрин повышает систолическое артериальное давление в большей степени, чем диастолическое. Повышение им артериального давления сопровождается брадикардией вследствие рефлекторной стимуляции блуждающего нерва. Так как повышение тонуса блуждающего нерва приводит возрастанию порога разрядов синусного узла и возбуждения ткани предсердий, данное явление может использоваться для купирования фенилэфрином пароксизмальной наджелудочковой тахикардии.

На ЦНС фенилэфрин не влияет.

Фенилэфрин за счёт стимуляции α_1-АР радиальной мышцы радужки вызывает её сокращение и расширение зрачка, снижает внутриглазное давление при открытоугольных формах глаукомы. На аккомодацию не влияет, так как ресничная мышца глаза не содержит α-адренорецепторов.

Стимулируя α_1-адренорецепторы кавернозной венозной ткани слизистой оболочки носа, фенилэфрин оказывает умеренное сосудосуживающее действие. Быстро и на длительное время устраняет отёк слизистой оболочки носа и его придаточных пазух.

В отличие от А и НА, не являясь катехоламином, фенилэфрин устойчив к ферментативной инактивации с участием КОМТ, поэтому может приниматься внутрь.

Показания к применению фенилэфрина те же, что для НА. Используется для повышения артериального давления при коллапсе и гипотензии различного происхождения, при наркозе для поддержания оптимального уровня артериального давления. Вводят внутривенно при пароксизмальной предсердной тахикардии. Так как фенилэфрин при местном применении суживает сосуды, уменьшает отёк воспалённых тканей и оказывает противовоспалительное действие, его используют при воспалительных заболеваниях слизистых оболочек носа и глаз. Его также применяют местно для расширения зрачков, а также внутривенно при учащённом мочеиспускании.

Помимо местного применения, отдельно и как комбинированное средство (виброцил — фенилэфрин + диметинден) для улучшения носового дыхания при ринитах фенилэфрин в составе комбинированных средств может приниматься внутрь (ринопронт — фенилэфрин + карбиноксамин). При приёме внутрь α-адреномиметики могут оказывать более выраженное влияние на гемодинамику и функции ЦНС, чем при местном применении, но в меньшей степени вызывают раздражение слизистой оболочки, реактивную гиперемию и ощущение заложенности носа при отмене, чем при местном применении.

По своим фармакологическим свойствам близок к фенилэфрину α_1-адреномиметик метоксамин, который аналогично фенилэфрину оказывает сильное сосудосуживающее действие на артерии и слабое на вены с рефлекторной брадикардией. Его применяют внутривенно при тяжёлых формах артериальной гипотонии.

Часть агонистов α_1-АР — мефентермин, метараминол оказывают помимо прямого адреномиметического также непрямое (симпатомиметическое) действие, увеличивая выброс медиатора норадреналина из адренергических нервных окончаний. Последнее может ограничить брадикардию, вызванную рефлекторной активацией блуждающего нерва и привести к увеличению минутного объёма сердца. Данный эффект типичен для сравнительно небольших доз препаратов. Характерной особенностью метараминола является уменьшение кровоснабжения таких жизненно важных органов, как

головной мозг и почки, что представляет опасность при его длительном применении. Сужение лёгочных сосудов под влиянием метараминола может привести к их отёку, что ограничивает его применение у больных с эмфиземой лёгких или при застойной сердечной ндостаточности.

Агонистом α_1-АР является мидодрин (гутрон), оказывающий стимулирующее действие на рецепторы только после превращения в различных тканях в активный метаболит десглимидодрин, который увеличивает АД, повышая тонус как артериол, так и венул. Так как гидролиз мидодрина идёт сравнительно медленно, то его сосудосуживающее действие развивается не так быстро как у норадреналина и мезатона. Так как препарат не проникает через ГЭБ, то он не действует на ЦНС.

В клинике мидодрин применяют внутрь (он быстро всасывается, попадает в плазму крови уже через 10 мин), внутримышечно и внутривенно. Так как мидодрин преимущественно суживает вены его используют при ортостатической гипотензии, а также при других видах гипотензии (артериальной гипотензии, вторичной гипотензии, связанной с применением лекарств, инфекционными заболеваниями, травмами и др.).

Среди побочных эффектов мидодрина следует отметить повышение АД в положении лёжа (так называемая клиностатическая гипертония, которая выражается в резком подъёме АД при переходе в лежачее положение), пиломоторная реакция (сокращение мышц, поднимающих волосы «гусиная кожа») усиление потоотделения, нарушения ЖКТ (диспептические явления, метеоризм и др.), нарушения (задержка и учащение) мочеиспускания.

Следует иметь в виду, что резкое сужение сосудов α-адреномиметкиами может привести к увеличению ОПСС и нагрузки на сердце, повышенному потреблению им кислорода и ишемии сердечной мышцы, вызвать приступ стенокардии и даже инфаркт миокарда. Резкое повышение артериального давления под влиянием α-адреномиметиков может вызвать отёк мозга и лёгких, привести к кровоизлиянию в мозг.

Агонисты α_2-адренорецепторов. α_2-Адреномиметики не являются абсолютно селективными средствами. Препараты данной группы могут влиять как на α_1-, так и на α_2-адренорецепторы. Как уже отмечалось эффект может зависеть от дозы препарата (например, ксилометазолин в низких концентрациях действует на α_2-АР, а при повышении концентрации начинает возбуждать α_1-АР).

Учитывая, что клиническое применение агонистов α_2-адренорецепторов основано на преимущественной стимуляции периферических или центральных α_2-адренорецепторов, их можно подразделить на 2 основные группы — агонисты периферических α_2-адренорецепторов и агонисты центральных α_2-адренорецепторов.

По химической структуре препараты, обладающие относительно избирательным действием на α_2-адренорецепторы (α_2-адреномиметики) — нафазолин (нафазол, нафтизин, санорин), ксилометазолин (галазолин), оксиметазолин (називин, назол), тетризолин и клофелин (клонидин, гемитон, катапресан) в отличие от α_1-адреномиметика фенилалкиламина (фенилэфрина, мезатона) являются производными имидазолина.

Способностью стимулировать α_2-адренорецепторы обладают также препараты разного химического строения — гуанфацин, метилдофа и др.

Агонисты периферических α_2-адренорецепторов. По сравнению с норадреналином и фенилэфрином (мезатоном) нафазолин и ксилометазолин вызывают более длительный сосудосуживающий эффект. При попадании в кровь они повышают артериальное давление; за счёт влияния на α_1-АР радиальной мышцы радужки глаза вызывают расширение зрачка. На ЦНС они оказывают угнетающее влияние.

В связи с плохой растворимостью в воде их используют в виде спиртового раствора или эмульсии только местно при ринитах различного происхождения.

Стимулируя α_2-адренорецепторы артериол и α_1-адренорецепторы вен слизистой оболочки носа, обладающей свойствами кавернозной ткани, они за счёт сосудосуживающего действия уменьшают гиперемию, набухание слизистой оболочки, отделение слизи и улучшают носовое дыхание.

Тетризолин (тизин) — производное имидазолина Являясь α-адреномиметиком, действует более длительно, чем другие препараты этой группы. Применяется при аллергическом конъюктивите, отёке слизистой оболочки носовой полости и носоглотки.

Длительный приём α-адреномиметиков из-за постоянного сужения сосудов может привести к атрофии и некрозу слизистой оболочки носа (эффект менее выражен у α_1-адреномиметиков), кроме того при длительном приёме наблюдается ослабление эффекта.

Кроме указанных препаратов при затруднении носового дыхания при простудных заболеваниях, воспалении носовых пазух, евстахиите, сенной лихорадке, аллергических ринитах используется производное имидазолина оксиметазолин (називин, назол). Препарат обладает сосудосуживающим, антиконгестивным действием. Сужает сосуды в местах аппликации, уменьшает приток крови к венозным синусам. Особенностью действия оксиметазолина, в отличие от ксилометазолина, является наличие у него, наряду с периферическим α_1-адреномиметическим действием, центрального α_{2A}-адреномиметического действия, что при попадании препарата в системный кровоток (например, при передозировке) приводит к снижению артериального давления (клонидиноподобный эффект).

Помимо лечения ринитов различного происхождения препараты данной группы могут применяться и при других заболеваниях.

Сосудосуживающее, противовоспалительное (противоотечное) действие нафазолина (препарат активирует α_1- и α_2-адренорецепторы) используется также при местной аппликации при конъюктивитах, при риноскопии для пролонгации поверхностной анестезии. α_1-Адреномиметики можно применять в качестве противоотечных средств при геморрое.

Использование α-адреноблокаторов для лечения импотенции может вызвать приапизм, в этом случае введение α-адреномиметиков в пещеристые тела полового члена уменьшает его проявления.

Агонисты центральных α_2-адренорецепторов. В отличие от α_2-адреномиметиков нафазола и ксилометазолина (галазолина), чей сосудосуживающий эффект связан с влиянием на периферические α_2-АР, ряд α_2-адреномиметиков типа клонидина оказывает не сосудосуживающее, а сосудорасширяющее действие за счёт стимуляции центральных α_2-АР.

Клонидин является производным имидазолина. По химическому строению напоминает нафазол (адреномиметик) и фентоламин (α-адреноблокатор).

Подобно нафазолу и ксилометазолину при местном применении α_2-адреномиметики типа клонидина могут вызывать сужение сосудов. Аналогично нафазолу клонидин активирует периферические α_1-АР сосудов и, кроме того, внесинаптические α_2-АР сосудов и оказывает непродолжительное прессорное действие.

В отличие от ксилометазолина (галазолина) и нафазола, клонидин хорошо растворяется в воде и липидах. Он хорошо всасывается при приёме внутрь (биодоступность порядка 100%). Проникая через гематоэнцефалический барьер в головной мозг, он оказывает выраженное гипотензивное действие за счёт стимуляции центральных α_2-АР.

Активация постсинаптических α_2-адренорецепторов (подтипа α_{2A}) нейронов ядер солитарного тракта в ростральной вентролатеральной части продолговатого мозга приводит к угнетению нейронов вазомоторного центра продолговатого мозга и снижению симпатического тонуса, что проявляется снижением концентрации НА в плазме крови. Под влиянием клонидина отмечено повышение парасимпатического тонуса. Уменьшение симпатического и повышение парасимпатического тонуса приводят к снижению частоты сердечных сокращений (ЧСС), уменьшению общего периферического сопротивления сосудов (в том числе за счёт расширения вен) и длительному и значительному понижению артериального давления.

Определённое значение в снижении артериального давления может иметь уменьшение импульсации в симпатическом звене периферической нервной системы на пресинаптическом уровне, возникающее за счёт снижения высвобождения норадреналина из адренергических нервных окончаний при стимуляции клонидином периферических пресинаптических α_2-адренорецепторов по принципу отрицательной обратной связи, регулирующих выброс НА в синаптическую щель.

При быстром внутривенном введении клонидина возможно непродолжительное (в течение нескольких минут) повышение АД в связи со стимуляцией периферических сосудистых постсинаптическтих α_1- и внесинаптических α_2-адренорецепторов (подтипа α_{2B}). Активация α_{2B}-адренорецепторов сосудов происходит в дозах, превышающих дозы, вызывающие активацию центральных нейрональных α_{2A}-адренорецепторов. Повышение артериального давления отсутствует при медленном внутривенном и других путях введения, в том числе при введении внутрь.

В последние годы, с учётом того, что α_2-АР практически отсутствуют в ростральном вентролатеральном отделе продолговатого мозга (ВЛПМ) — области продолговатого мозга, отвечающей за тонический и рефлекторный контроль над симпатической нервной системой, важнейшая роль в гипотензивном эффекте клонидина придаётся его действию не на α_2-АР, а на центральные I_1- и периферические I_1-имидазолиновые рецепторы.

Активация I_1-имидазолиновых рецепторов в ВЛПМ клонидином приводит к угнетению вставочных нейронов промежуточной зоны спинного мозга, что вызывает подавление активности симпатических преганглионарных нейронов спинного мозга, Это сопровождается угнетением активности симпатической нервной системы с последующим уменьшением высвобождения катехоламинов из окончаний симпатических нейронов.

Периферические I_1-имидазолиновые рецепторы находятся в почках, надпоченике, окончаниях симпатических нервов, плаценте. Активация периферических I_1-рецепторов в адреномедуллярных клетках надпочечника вызывает прямое уменьшение выделения адреналина из мозгового слоя надпочечника, в почках — уменьшение выделения ренина, а в окончаниях симпатических нервов — прямое ингибирование высвобождения НА в синаптичекую щель.

Клофелин применяется при различных формах гипертонической болезни и для купирования гипертонического криза, оказывает благоприятное влияние на больных с сердечной недостаточностью и больных острым инфарктом миокарда.

Эффективен как гипотензивное средство в малых дозах — 0,1 мг, суточная доза — 0,3–1 мг. Гипотензивное влияние клофелина проявляется обычно через 1–2 ч после приёма препарата внутрь и продолжается после однократного приёма 6–8 ч.

При резкой отмене клофелина после его длительного приёма может быть гипертонический криз («синдром отмены»), связанный в повышением активности симпатической нервной системы.

Так как возбуждение клонидином периферических α-АР вызывает снижение внутриглазного давления за счёт уменьшения секреции внутриглазной жидкости

и улучшения её оттока, его используют в офтальмологической практике для лечения первичной открытоугольной глаукомы. Миоз при этом не развивается. В качестве глазных капель используется 0,1–0,5% раствор клофелина в тюбик-капельницах. Клонидин всасывается слизистой оболочкой глаз, поэтому при его применении возможны такие нежелательные в данном случае побочные эффекты центрального происхождения, как понижение АД, брадикардия, сухость во рту, сонливость.

Кроме выраженного седативного действия клонидин обладает анальгетической активностью центрального происхождения, которые находят применение в клинике.

Гемодинамическое, седативное, анксиолитическое, анальгетическое, а также уменьшающее секрецию слюнных желёз действие клонидина используется при общей анестезии.

Небольшие дозы клонидина используются для профилактики головных болей, вызванных мигренью.

Клонидин и другие агонисты α_2-АР используются для лечения синдрома абстиненции, вызванной приёмом морфина, этанола, а также курением, что во многом связано с уменьшением активности симпатической нервной системы, повышенной при синдроме абстиненции.

Основные и наиболее частые побочные эффекты (слабость, заторможенность и сухость во рту) клонидина и других центральных α_2-адреномиметиков являются следствием основного механизма их действия — стимуляции центральных α_2-адренорецепторов. По этой причине сложной является разработка новых центральных антигипертензивных агонистов α_2-АР, лишённых этих побочных свойств.

Седативное действие развивается из-за тормозящего влияния α_2-адреномиметиков на восходящую активирующую ретикулярную формацию при активации ими α_2-адренорецепторов ствола мозга.

Сухость во рту также является следствием активации центральных α_2-АР, приводящей к угнетению активности слюноотделительных центров продолговатого мозга.

При назначении α_2-агонистов необходимо учитывать их возбуждающее действие на α_2-АР тромбоцитов, вызывающее их агрегацию.

При повышении доз клонидина, при передозировке или применении не по медицинским показаниям он вызывает тяжёлые явления: нарушения сознания, коллапс, падение температуры тела и др.

Кроме клонидина в клинике используются другие α_2-адреномиметики, обладающие сходным с ним механизмом действия, лечебным и побочными эффектами.

Гуанфацин (производное фенилацетиплгуанидина) обладает более избирательным влиянием на α_2-адренорецепторы, чем клонидин. По сравнению с клофилином он действует продолжительнее (можно принимать 1 раз в день) и у него в меньшей степени выражены побочные эффекты (сухость во рту и седативное действие).

Способность α_2-адреномиметиков при активации α_2-АР, расположенных на холинергических нервах, иннервирующих ЖКТ, вызывать задержку выделения ацетилхолина может служить основанием для использования α_2-агонистов для лечения язвы желудка.

Антидиарейный эффект α_2-адреномиметиков связан с повышением всасывания NaCl и воды при активации α_2-АР в нижней части желудочно-кишечного тракта.

В качестве успокоительных средств могут найти применение недавно разработанные новые специфические агонисты α_2-АР дитолидин и митедомидин. Одним из преимуществ их использования, по сравнению с бензодиазепинами, является быстрая и полная обратимость их действия.

α_2-Агонисты в малых дозах обладают анксиолитическими свойствами. Во многих отношениях спектр анксиолитической активности этих препаратов сходен с новыми анксиолитиками, которые действуют в качестве агонистов 5-HT_{1A}-рецепторов.

Механизм спазмолитического действия такого известного миорелаксанта, как тизанидин, связан с его специфическим агонистическим действием в отношении α_2-АР, что приводит к задержке выделения возбуждающих аминокислот, в частности, аспартата в спинном мозге.

3. Вещества, активирующие преимущественно β-адренорецепторы (β-адреномиметики). Неселективные агонисты β-адренорецепторов типа изопреналина ранее широко применялись для лечения бронхиальной астмы. Обладая выраженной бронхорасширяющей способностью, связанной с возбуждением β_2-АР бронхов, они одновременно за счёт возбуждения β_1-АР оказывают побочное действие на сердце (учащение и усиление сердцебиения, аритмии) и теперь заменены селективными агонистами адренорецепторов.

Вещества, избирательно влияющие на β_1- и β_2-адренорецепторы. В отличие от избирательных α_1-адреномиметиков не имеющих существенных преимуществ перед неизбирательными препаратами, избирательные β_1- и β_2-адреномиметики достаточно чётко дифференцированы по спектру фармакологической активности и побочным эффектам.

Агонисты β_1-адренорецепторов. Добутамин является производным дофамина, от которого отличается наличием пара-оксифенилметилпропильного радикала у аминогруппы. Применяемый в клинике препарат представляет собой рацемическую смесь из лево- и правововращающего изомеров, обладающих различной активностью в отношении α- и β-адренорецепторов, что может повлиять на его фармакологические свойства. Так, L-изомер добутамина является α_1-агонистом, напротив D-изомер является α_1-адреноблокатором и одновременно значительно более сильным стимулятором β_1-адренорецепторов, чем L-изомер.

За счёт стимуляции β_1-адренорецепторов сердца добутамин оказывает избирательное инотропное и слабое хронотропное действие. Обладает умеренным сосудорасширяющим действием, обусловленным некоторой стимуляцией β_2-адренорецепторов сосудов. Добутамин увеличивает коронарный кровоток. Сосуды почек, в отличие от дофамина, добутамин не расширяет.

Благодаря наличию слабой сосудорасширяющей активности он в меньшей степени вызывает рефлекторную тахикардию при повышении сердечного выброса, характерную для изадрина. Добутамин слабо влияет на автоматизм желудочков сердца. Риск развития аритмий при применении добутамина по сравнению с другими катехоламинами меньше.

Добутамин используют как кардиотоническое средство при острой сердечной недостаточности и некоторых формах хронической сердечной недостаточности. У пациентов с сердечной недостаточностью вследствие пониженного сердечного выброса добутамин, не увеличивая ритма, повышает ударный объём сердца. Препарат может заменять сердечные гликозиды при их неэффективности у больных с ишемической болезнью сердца.

Так как добутамин действует кратковременно, его вводят внутривенно, медленно, в 5%-м растворе глюкозы путём инфузии со скоростью 2,5–10 мкг/(кг · мин).

При применении добутамина возможны осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы — тахикардия, аритмия, повышение артериального даления, боль в области сердца и др.

Агонисты β_2-адренорецепторов. Избирательные агонисты β_2-адренорецепторов (на β_1-подтип адренорецепторов они действуют только в больших дозах) в настоящее время наиболее широко применяются для лечения бронхиальной астмы. Они эффективны при всех видах приёма (ингаляционно, внутрь, парентерально) [14].

Так как они практически не действуют на β_1-адренорецепторы сердца (их бронхолитический эффект развивается в дозах, незначительно влияющих на работу сердца), то при лечении бронхиальной астмы у них слабо выражены побочные эффекты (в первую очередь тахикардия и аритмии), характерные для неспецифического активатора β_1 и β_2-адренорецепторов изадрина.

В настоящее время в качестве бронхолитиков наиболее широко используют избирательные β_2-агонисты: сальбутамол, фенотерол (беротек).

Благоприятный эффект избирательных β_2-адреномиметиков при бронхиальной астме связан со стимуляцией β_2-АР бронхов, за которой следует расслабление гладкой мускулатуры дыхательных путей. Кроме того, уменьшению бронхоспазма способствует ингибирование β_2-адреномиметиками высвобождения из тучных клеток (содержат β_2-АР) веществ (гистамина и др.), способствующих бронхоспазму и развитию воспаления. Они относительно длительно действуют, так как не инактивируются МАО и КОМТ и не подвергаются обратному захвату в пресинаптических нервных окончаниях.

При ингаляционном введении β_2-агонисты действуют так же быстро и сильно, как изадрин, но дают более продолжительный эффект с меньшим числом побочных эффектов.

Свойство агонистов β_2-АР расширять кровеносные сосуды используется при кардиогенном шоке и хронической сердечной недостаточности; их способность снижать сократительную активность матки (в матке находятся β_2-АР, активация которых снижает тонус гладкой мускулатуры матки) — для предупреждения преждевременных родов (сальбутамол, внутривенно).

Побочные эффекты β-адреномиметиков реже наблюдаются при ингалаяционном пути введения, когда в крови наблюдается его низкая концентрация и чаще при других путях введения.

При увеличении содержания препарата в крови наблюдается тремор (как следстве активации β_2-адренорецепторов скелетных мышц), нервное напряжение (тревожность и беспокойство) и тахикардия (связана с наличием в сердце небольшой фракции β_2-адренорецепторов), которые обычно не проявляются при ингаляционном введении препаратов.

4.2.2. Адренергические вещества непрямого типа действия (адреномиметики непрямого типа действия)

1. *Симпатомиметики.* Лекарственные вещества, относящиеся к данной группе, как и препараты прямого типа действия, оказывают стимулирующее влияние на адренорецепторы.

Принципиальным отличием от прямых адреномиметиков, непосредственно связывающихся с адренорецепторами, является их влияние на различные звенья обмена катехоламинов, что увеличивает концентрацию медиатора в синаптической щели, повышая тем самым активность адренорецепторов.

Адренергические средства непрямого типа действия могут влиять на биосинтез катехоламинов и систему его регуляции, депонирование везикул и выброс медиатора в синаптическую щель, системы нейронального и экстранейронального захвата, катаболизм катехоламинов и др. Часть этих препаратов может оказывать частичное прямое адреномиметическое действие.

Их влияние на обмен катехоламинов может реализовываться за счёт различных механизмов, из которых один или несколько являются основными.

Многие из них, в отличие от прямых адреномиметиков, слабо проникающих через гематоэнцефалический барьер, оказывают выраженное центральное действие на головной мозг. Для таких соединений фактором, определяющим их клиническое

использование (в основном как психотропных перапаратов), является влияние на адренореактивные структуры головного мозга, а действие на периферические адренореактивные структуры является проявлением побочного эффекта.

Адренергическим средствам непрямого типа действия присуще преобладание α-адренергических влияний, обусловленное действием на обмен НА, который в физиологических концентрациях действует преимущественно на α-адренорецепторы. Для них характерно действие на органы, содержащие α_1- и α_2-адренорецепторы. а также сердце (в нём преобладают β_1-адренорецепторы, на которые НА, в отличие от β_2-адренорецепторов, также действует).

Симпатомиметики с преимущественно периферической активностью. Основным механизмом симпатомиметического действия эфедрина (он имеет структурное сходство с норадреналином) является его захват переносчиками пресинаптических окончаний адренергических волокон, которые в физиологических условиях отвечают за обратный нейрональный захват НА и действуют относительно неспецифично.

После захвата и переноса в аксоплазму симпатомиметики высвобождают как везикулярный (они захватываются также переносчиком синаптических пузырьков), так и невезикулярный НА; при этом часть выделившегося из везикул НА в аксоплазме метаболизируется МАО, остальной НА высвобождается в синаптическую щель.

Для их химической структуры характерно отсутствие ОН-группы в бензольном кольце и наличие метильной группы на α-углероде боковой цепи. Вещества с ОН-группой на β-углероде (эфедрин) имеют некоторое сродство к рецептору, т. е. они являются прямо и непрямо действующими адреномиметиками. Вещества без данной ОН-группы (мефентермин, амфетамин) являются только непрямыми адреномиметиками (симпатомиметиками). Отсутствие ОН-группы одновременно повышает липофильность соединения, так что симпатомиметики могут попадать в аксоплазму адренергических волокон путём пассивной диффузии.

Этот вид высвобождения НА не связан с деполяризацией и присутствием внеклеточных ионов Ca^{2+}, как это имеет место при физиологических условиях. За счёт связывания симпатомиметика с переносчиками обратный захват норадреналина затруднён. Поскольку обратный захват более важен в определении количества медиатора, чем его новый синтез, быстрое и повторное применение симпатомиметиков уменьшает количество НА и, соответственно, его эффекты. Именно данным механизмом можно объяснить явление тахифилаксии (уменьшение эффекта при повторном введении препарата), характерное для симпатомиметиков.

Эфедрин — алкалоид из растений рода *Ephedra* оказывает как прямое, так и непрямое действие на α- и β-АР. Активируя все виды рецепторов, эфедрин в большей степени возбуждает α_1-АР. Благодаря тому, что его эффекты во многом обусловлены не прямым действием на адренорецепторы, а высвобождением норадреналина, его относят к адреномиметикам непрямого действия (симпатомиметикам). Он также может угнетать нейрональный захват норадреналина.

Эфедрин оказывает бронхолитическое действие (за счёт прямого действия на β_2-адренорецепторы бронхов), угнетает перистальтику кишечника, расслабляет гладкую мускулатуру матки, расширяет зрачок (на аккомодацию и внутриглазное давление не влияет), вызывает гипергликемию. В целом, по спектру фармакологического действия он похож на норадреналин и адреналин. По активности уступает адреналину, но действует более продолжительно. Слабее, чем эндогенные катехоламины, действует на сердечно-сосудистую систему (обладает положительным ино-, хроно-, дромо- и батмотропным действием на сердце) и гладкие мышцы. Повышает артериальное давление. Для него характерно явление тахифилаксии, которое в случае эфедрина выражается в быстром снижении способности повышать артериальное давление при повторном введении. Эфедрин отличается от эндогенных катехолами-

норв центральностимулирующим действием. Его стимулирующее влияние на ЦНС подобно фенамину, но значительно слабее. При приёме терапевтических доз он часто вызывает нервное возбуждение, нарушение сна, стимулирует мыслительные процессы, кроме того, он повышает рефлекторную деятельность спинного мозга, глубину и частоту дыхания. Повышает тонус скелетных мышц, в больших дозах может вызывать судороги.

В отличие от адреналина и норадреналина эфедрин может применяться внутрь, так как угнетает активность ферментов инактивирующих катехоламины — МАО и КОМТ.

Эфедрин используют при бронхиальной астме, аллергических заболеваниях, гипотониях различного происхождения.

Местно эфедрин применяют в качестве сосудосуживающего средства при ринитах, он улучшает носовое дыхание, уменьшает количество отделяемого и явления воспаления. Эфедрин является самым безопасным препаратом в форме носовых капель. Более сильные адреномиметки (ксилометазолин и оксиметазолин) чаще вызывают эффект последействия.

В составе с другими препаратами в форме комбинированного препарата эфедрин в виде псевдоэфедрина (D-эфедрина) используют внутрь при насморке для устранения заложенности носа при системном применении (например, в состав комбинированного средства Клариназе-12 входят псевдоэфедрин + лоратидин).

Так же местно эфедрин применяют для расширения зрачка с диагностической целью.

Стимулирующее действие эфедрина на ЦНС может использоваться при нарколепсии, отравлениях снотворными и наркотиками.

Эфедрин или псевдоэфедрин иногда применяют для устранения недержания мочи при напряжении (при кашле, резком усилии).

2. *Адренергические вещества, преимущественно угнетающие нейрональный или экстранейрональный захват катехоламинов.* Наряду с эфедрином, реализующим своё непрямое адреномиметическое действие в основном за счёт высвобождения НА из нервных окончаний, ряд адренергических средств оказывает его путём влияния на другие процессы, протекающие в адренергическом синапсе.

С формальной точки зрения не всегда эти препараты можно назвать классическими симпатомиметиками (т. е. веществами, подобными эфедрину), так как не все из них в организме вызывают типичные периферические адреномиметические (симпатомиметические) эффекты, характерные для активации симпатической нервной системы. Например, ингбиторы МАО на артериальное давление могут повлиять по-разному. С одной стороны, повышая уровень норадреналина и адреналина в крови, они увеличивают артериальное давление, с другой — за счёт угнетения сосудодвигательного центра его снижают. Как полагают, их гипотензивная активность может быть связана и с уменьшением высвобождения НА из адренергических нервных окончаний. У ряда веществ (например, трициклических антидепрессантов) способность увеличивать содержание НА в синаптической щели в качестве лечебного фактора реализуется не на периферии, а в ЦНС.

Одним из процессов в адренергических синапсах, за счёт влияния на который можно оказывать симпатомиметическое действие, является обратный захват КА. Активный захват в нейрональную ткань (обратный захват) и захват в экстранейрональную ткань (мышечные, железистые и др. клетки) лимитирует действие высвобожденного норадреналина. Блокада обоих видов транспорта повышает концентрацию действующего на рецепторы медиатора и вызывает непрямые адреномиметические эффекты.

При приёме большинства лекарственных средств данный эффект наблюдается как побочное действие, и только у трициклических антидепрессантов (угнетение обратного захвата уже выделенных катехоламинов и других аминов) этот механизм лежит в основе терапевтического антидепрессорного эффекта. В условиях функциональной недостаточности нейромедиатора подавление обратного захвата повышает его эффективную концентрацию в соответствующей рецепторной области постсинаптических мембран, компенсируя тем самым его недостаток.

Нейрональная и экстранейрональная системы транспорта катехоламинов отличаются сродством к разным лекарственным веществам и, соответственно, по-разному ингибируются. Так, например, антидепрессанты дезипрамин и имипрамин, местный анестетик кокаин угнетают избирательно нейрональный захват катехоламинов (за счёт связывания и последующего ингибирования переносчика, который транспортирует НА и близкие по структуре молекулы в аксоплазму нервного окончания). Для кокаина непрямое адреномиметическое действие проявляется на периферии в сужении сосудов, тахикардии с повышением артериального давления, расширении зрачка (мидриазе), а в центре — в стимуляции ЦНС (за счёт угнетения обратного захвата катехоламинов, прежде всего дофамина, в центральных синапсах). При терапии трициклическими антидепрессантами могут наблюдаться такие побочные эффекты, как тахикардия и аритмии.

Для регуляции деятельности внутренних органов упомянутые выше препараты не используются.

3. Адренергические вещества, преимущественно угнетающие ферментативный распад катехоламинов. Ещё одной группой лекарственных веществ, потенциально способной повысить уровень катехоламинов в синаптической щели, являются ингибиторы ферментов, участвующих в метаболической инактивации катехоламинов, — МАО и КОМТ.

На распад адреномиметиков с участием МАО и КОМТ влияют следующие особенности структуры адрено- и симпатомиметиков: замещение на α-углероде и на азоте больше чем одной метильной группы предотвращает распад веществ МАО (эфедрин, β-адреномиметики); условием для метилирования ОН-группы в третьем положении КОМТ является наличие ОН-группы в четвёртом положении. Поэтому соединения, которые имеют только одну ОН-группу либо в 3-м положении (фенилэфрин), либо в четвёртом положении (буфенин), либо в 3-м и 5-м положении (орципреналин, тербуталин, фенотерол), не подвергаются действию КОМТ.

Локализованная в адренергических нервных окончаниях МАО является митохондриальным ферментом, который инактивирует находящиеся в аксоплазме КА, в том числе попавшие туда после обратного захвата через пресинаптическую мембрану. Ингибиторы МАО вызывают накопление в аксоплазме экстравезикулярного норадреналина до величины, при которой механизмы обратного захвата перестают функционировать. При этом НА может самопроизвольно диффундировать в синаптическую щель.

Поскольку действие норадреналина заканчивается после его обратного захвата (катехоламины в основном интактивируются в синаптической щели не ферментативно, а за счёт обратного захвата), ингибирование ферментативной инактивации катехоламинов с участие ингибиторов МАО и КОМТ в меньшей степени усиливает эффекты стимуляции симпатической нервной системы или введённых извне в организм эндогенных катехоламинов (норадреналина, адреналина) по сравнению с эффектами ингибиторов ацетилхолинэстеразы (ограничивающей действия ацетилхолина в холинергических синапсах) в отношении холиномиметических эффектов.

В меньшей степени ингибиторы МАО и КОМТ усиливают эффекты выделяющегося из адренергических окончаний норадреналина и по сравнению с непрямыми адреномиметиками, повышающими концентрацию НА в синаптической щели (эфедрином и фенамином) и ингибиторами обратного захвата катехоламинов (кокаином и имипрамином). На практике более важным является потенциирование ингибиторами МАО действия экзогенно введённых адреномиметиков.

В клинике ингибиторы МАО используются как антидепрессанты. Ингибитором КОМТ является пирогаллол, который из-за высокой токсичности практического значения как лечебное средство не имеет.

4.2.3. Фармакокинетика адреномиметиков прямого и непрямого типа действия. При пероральном введении адреномиметиков их распад под действием МАО и КОМТ начинается в слизистой оболочке кишечника и в печени. При местном нанесении на слизистые оболочки, субокципитальном и внутримышечном введении скорость резорбции адреномиметиков уменьшается за счёт сокращения сосудов. После внутривенного введения катехоламины действуют только в течение нескольких минут из-за быстрой инактивации путём нейронального и экстранейронального захвата, накопления в везикулах или из-за быстрого метаболизма.

Терапевтические эффекты при применении катехоламинов достигаются только при постоянном применении.

Адреномиметики, на которые МАО и КОМТ не влияют, действуют после введения перорально и парентерально в течение нескольких часов.

Они выделяются из организма либо после гидроксилирования в четвёртом положении на бензольном кольце и последующем присоединении серной или глюкуроновой кислот, либо в неизменённом виде в зависимости от pH с мочой (эфедрин, мефентермин).

Эфедрин за счёт высокой липофильности хорошо проникает через ГЭБ в головной мозг. Симпатомиметики с фенольной и спиртовой ОН-группой на ЦНС не действуют.

4.3. Антиадренергические средства

Антиадренергические средства (вещества) — вещества природного и синтетического происхождения, уменьшающие (блокирующие) полностью или частично в организме животных и человека эффекты эндогенных катехоламинов (КА) — адреналина (А), норадреналина (НА) за счёт влияния на адренореактивные структуры (адренорецепторы (АР), структурные элементы клетки, участвующие в обмене и транспорте эндогенных катехоламинов и др.) [19].

Эффекты эндогенных катехоламинов синаптического (НА) и надпочечникового (А) происхождения в организме реализуются с участием адренергических синапсов и входящих в их состав пре- и постсинаптических адренорецепторов, а также внесинаптических адренорецепторов, расположенных вне адренергических синапсов.

В зависимости от особенностей действия на адренорецепторы, антиадренергические вещества можно подразделить на препараты прямого и непрямого (косвенного) типа действия.

Антиадренергические вещества непрямого типа действия (симпатолитики), влияя на обмен катехоламинов (выброс медиатора, обратный захват, депонирование в синаптических пузырьках и др.), уменьшают концентрацию НА в синаптической щели, снижая тем самым активность адренорецепторов.

Антиадренергические вещества прямого типа действия (адреноблокаторы, АБ) препятствуют активирующему влиянию КА на адренорецепторы эффекторных клеток за счёт непосредственного связывания с адренорецепторами.

Как и в случае с адреномиметиками несколько сложнее классифицировать по типу действия антиадренергические вещества, влияющие на пресинаптические адренорецепторы, находящиеся в нервных окончаниях (адренергических, холинергических и др.).

Поскольку такие вещества вызывают эффекты за счёт непосредственного взаимодействия с адренорецепторами, то их можно было бы отнести к группе препаратов прямого типа действия. Но с другой стороны, их влияние на функцию органов и тканей обусловлено изменением концентрации медиатора (НА, АХ и др.) в синаптической щели, т. е. их можно определить и как адренергические вещества непрямого типа действия.

При рассмотрении характера адренергических влияний необходимо иметь в виду, что блокада адренорецепторов не всегда оказывает антиадренергическое действие на эффекторные клетки. В частности, при блокаде по принципу отрицательной обратной связи пресинаптических α_2-адренорецепторов, регулирующих выброс НА в синаптическую щель, выделение НА в синаптическую щель усиливается, т. е. развивается не антиадренергическое, а адреномиметическое действие.

При анализе эффектов антиадренергических веществ в различных органах необходимо иметь ввиду, что антиадренергические вещества полностью или частично (в зависимости от тропности к отдельным типам адренорецепторов) блокируют эффекты в основном симпатического отдела вегетативной нервной системы, что приводит к преобладанию парасимпатических влияний на органы.

Также необходимо учитывать, что антиадренергические вещества могут влиять на активность парасимпатической нервной системы за счёт блокирующего действия на пресинаптические адренорецепторы, локализованные в области окончаний ряда холинергических нервов парасимпатической нервной системы, от активности которых зависит выделение ацетилхолина в синаптическую щель холинергических синапсов (например, иннервирующих ЖКТ).

В зависимости от типа действия и тропности в отношении отдельных видов рецепторов антиадренергические вещества можно классифицировать следующим образом.

I. Вещества прямого типа действия (блокаторы адренорецепторов, адреноблокаторы).

1. Вещества, блокирующие α- и β-АР (неселективные α- и β-адреноблокаторы).
2. Вещества, блокирующие α_1- и α_2-АР (неселективные α-адреноблокаторы):
   — вещества, блокирующие α_1-АР (селективные α_1-АБ);
   — вещества, блокирующие α_2-АР (селективные α_2-АБ).
3. Вещества, блокирующие β-адренорецепторы:
   — вещества, блокирующие β_1- и β_2-АР (неселективные β-адреноблокаторы);
   — вещества, блокирующие β_1-АР (селективные β_1-АБ);
   — вещества, блокирующие β_2-АР (селективные β_2-АБ).

II. Вещества непрямого типа действия (симпатолитики).

Антиадренергические вещества угнетают с различной степенью избирательности адренергические влияния на эффекторные органы как НА, выделяющегося в адренергических синапсах, так и А, выделяющегося из надпочечников.

При блокаде пост- и пресинаптических адренорецепторов трансформируется передача регуляторных нервных импульсов симпатической нервной системы (в адренергических нервах), а при блокаде внесинаптических адренорецепторов блокируются эффекты циркулирующих в крови эндогенных катехоламинов (А и НА).

Применяют антиадренергические средства главным образом при лечении гипертонии, для расширения артериальных сосудов в различных органах, уменьшения частоты и силы сердечных сокращений и при других заболеваниях, связанных с чрезмерным тонусом симпатической нервной системы.

4.3.1. Антиадренергические средства прямого типа действия (блокаторы адренорецепторов, адреноблокаторы)

Вещества, блокирующие α- и β-адренорецепторы. Неселективные (неспецифические, неизбирательные) адреноблокаторы (α- и β-адреноблокаторы) одновременно блокируют оба типа адренорецепторов. К ним относятся лабеталол, карведилол, проксодолол и др.

Учитывая, что β-адреноблокирующее действие у этих препаратов преобладает над α-адреноблокирующей активностью, в последние годы их всё чаще рассматривают как β-АБ, обладающие α-адреноблокирующей активностью.

β-Адреноблокирующее действие этих препаратов может проявляться в отрицательном хроно-, дромо-, батмо- и инотропном эффектах, угнетении ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. За счёт блокирующего действия на α_1-адренорецепторы сосудов они обладают сосудорасширяющим эффектом. Сочетание β-блокирующего и периферического вазодилатирующего действия обеспечивает выраженный гипотензивный эффект.

Лабеталол (трандат) блокирует α_1- и β_1-адренорецепторы. Он блокирует и β_2-АР, но одновременно является их частичным агонистом. Кроме того, лабеталол угнетает обратный нейрональный захват норадреналина. Блокирующее влияние на β-АР у лабеталола больше в 3–10 раз, чем на α_1-АР.

Лабеталол при внутривенном введении вызывает быстрое снижение артериального давления за счёт расширения периферических сосудов и уменьшения общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС). Расширение сосудов является следствием блокады лабеталолом сосудосуживающих α_1-адренорецепторов, а из-за наличия внутренней симпатомиметической активности в отношении β_2-адренорецепторов и стимуляции сосудорасширяющих β_2-адренорецепторов.

При этом не происходит значительного изменения частоты сердечных сокращений и сердечного выброса.

Благодаря неспецифической α- и β-адреноблокирующей активности лабеталол используется при различных формах артериальной гипертензии. Принимается внутрь в виде таблеток или вводится внутривенно при неотложных состояниях (гипертонический криз, феохромоцитома, регуляция артериального давления до и во время операций, в том числе на сердечно-сосудистой системе и др.).

Лабеталол является относительно слабым β- и α-адреноблокатором (по β-адреноблокирующей активности лабеталол уступает пропранололу в 3–16 раз, а по α-блокирующей активности — фентоламину в 2–7 раз.) Отсюда менее выраженные побочные явления, характерные для избирательных α_1- и β-адреноблокаторов.

Карведилол (акридилол) — блокирует β_1-, β_2-АР и α_1-АР. Блокирующее влияние на β-АР в 10–100 раз больше, чем на α_1-АР. Не обладает собственной симпатомиметической активностью. Препарат обладает выраженной антиоксидантной и мембраностабилизирующей активностью. Является липофильным соединением.

За счёт смешанного β- и α-адреноблокирующего действия карведилол осуществляет более полную блокаду симпатической активности в организме по сравнению с чистыми β-адреноблокаторами.

При приёме карведилола не происходит значительного изменения частоты сердечных сокращений и сердечного выброса. В отличие от избирательных β_1-адреноблокаторов карведилол не увеличивает плотность β_1-АР и, тем самым, не усиливает неблагоприятное действие на миокард повышенной активности симпатической нервной системы, характерной для больных хронической сердечной недостаточностью.

Будучи β-АБ, угнетает ренин-ангиотензин-альдостероновую систему. Подавляет продукцию ренина. Уменьшает пред- и постнагрузку на сердце.

Карведилол, как и лабеталол, являясь сосудорасширяющим средством (блокада постсинаптических α_1-АР сосудов и пресинаптических β_2-адренорецепторов, угнетающих выход НА в синаптическую щель), снижает повышенное артериальное давление без сужения периферических сосудов и повышения общего периферического сопротивления сосудов, что происходит при использования типичных β-адреноблокаторов, не обладающих сосудорасширяющей активностью. По этой же причине не возникает ощущения похолодания конечностей.

Карведилол за счёт α-адреноблокирующей активности уменьшает отрицательное влияние на углеводный и липидный обмен блокады β_1-адренорецепторов. В отличие от избирательных β_1-адреноблокаторов карведилол не снижает чувствительность периферических тканей к инсулину и утилизацию глюкозы и, соответственно, не вызывает гиперинсулинемию и не увеличивает уровень гликозилированного гемоглобина. Чувствительность периферических тканей к инсулину под влиянием карведилола может даже возрастать.

Продолжительность гипотензивного действия до 24 ч, что значительно больше лабеталола.

Карведилол применяют при артериальной гипертонии, стенокардии, хронической сердечной недостаточности. Среди β-адреноблокаторов в сочетании с ингибиторами АПФ именно карведилол является лучшим для лечения больных сахарным диабетом с сердечной недостаточностью.

Побочные эффекты карведилола — головокружение, головная боль, бронхоспазм, утомляемость, кожные реакции.

Проксодолол — отечественный препарат, сочетающий β- и α-адреноблокирующее действие. Обладает антигипертензивной, антиишемической и антиаритмической активностью, при местном применении снижает внутриглазное давление за счёт уменьшения объёма водянистой влаги. Показания к применению — как у других неспецифических α- и β-адреноблокаторов (артериальная гипертензия, гипертонические кризы, стенокардия, аритмия, глаукома).

1. *Вещества, блокирующие α-адренорецепторы.* Характерной особенностью действия α-адреноблокаторов (α-АБ), определяющей лечебный и побочные эффекты, является их блокирующее влияние на постсинаптические α_1-АР, пре- и внесинаптические α_2-АР, зависящее от избирательности действия в отношении того или иного типа адренорецепторов.

Сердечно-сосудистая система. α-АР, расположенные на гладкомышечных клетках сосудов, играют ведущую роль в поддержании артериального и венозного тонуса.

Блокада α-АР вызывает расширение артерий, но преимущественно — артериол, прекапиллярных сфинктеров (в том числе коронарных и лёгочных) и вен, что приводит к снижению ОПСС и как следствие — падению артериального давления.

Расширение лёгочных артериол под влиянием α-АБ ведёт к снижению давления в малом круге кровообращения и уменьшению нагрузки на миокард, что объясняет их эффективность при острой левожелудочковой недостаточности (например, при инфаркте миокарда).

α-АБ, расширяя артериолы и прекапиллярные сфинктеры, значительно улучшают кровоснабжение головного мозга, мышц, кожи, слизистых.

Расширение вен (ёмкостных сосудов) приводит к депонированию в них крови и уменьшению венозного возврата к сердцу; это является причиной ортостатической гипотензии (резкое снижение артериального давления при переходе из положения лёжа в положение стоя), а также тахикардии.

Тахикардия развивается также в связи с блокадой пресинаптических α_2-АР.

Если стимуляция α_1-АР шейки мочевого пузыря, простатического отдела уретры (мочеиспускательного канала), капсулы и собственно ткани предстательной железы в результате прогрессирования доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) приводит к повышению тонуса их гладкомышечных структур и развитию обструкции, то блокада α_1-АР приводит к снижению тонуса гладкомышечных структур шейки мочевого пузыря и простаты, что в свою очередь проявляется снижением обструкции и улучшением опорожнения мочевого пузыря. Блокада α-АР дна мочевого пузыря также приводит к снижению сопротивления при мочеиспускании и ретроградной эякуляции. Сочетанное применение α-АБ и неспецифического вазодилататора папаверина непосредственно в половой орган у мужчин вызывает стойкую эрекцию.

Блокада α_1-АР желудочно-кишечного тракта приводит к усилению его перистальтики и секреторной функции (повышается секреция соляной кислоты в желудке).

Блокада α_1-АР радиальной мышцы глаза приводит к сужению зрачка (миозу), а также снижает адренергическую стимуляцию потоотделения, заложенность носа и др.

Вещества, блокирующие α_1- и α_2-адренорецепторы. Группа неселективных α-адреноблокаторов (α_1- и α_2-АБ) включает в себя вещества природного и синтетического происхождения.

Дигидрированные алкалоиды спорыньи. В группу веществ, блокирующих α_1- и α_2-АР входят дигидрированные производные алкалоидов маточных рожков (*Secale Cornutum*) — дигидроэрготоксин, дигидроэрготамин и др.

Спорынья или маточные рожки (secale cornutum) представляет собой склероций (размером 2×4 см) грибка, паразитирующего на колосьях ряда злаков, главным образом ржи.

Главными алкалоидами спорыньи являются: эрготоксин, эрготамин, эргометрин и др. Спорынья содержит также ряд других биологически активных веществ: ацетилхолин, гистамин, тирамин и др.

В химическом отношение алкалоиды спорыньи являются производными лизергиновой кислоты, в молекулу которой входят индоловый и хинолиновый гетероциклы.

Алкалоиды спорыньи влияют на различные типы рецепторов: α-АР, дофаминовые и серотониновые (5-HT_2) рецепторы.

Алкалоиды спорыньи, в частности эрготамин и эрготоксин, в больших дозах действуют на α-АР артериол и вызывают вазоконстрикцию, они также могут повреждать эндотелий сосудов. Из-за медленной диссоциации комплекса эрготамин–α-АР эффект очень продолжительный. Эрготамин, как и другие алкалоиды спорыньи, является частичным агонистом 5-HT_2-рецепторов сосудов, что может усиливать его вазоконстрикторное действие.

При длительном приёме алкалоидов спорыньи (например, при употреблении в пищу загрязнённого зерна или приёме препаратов спорыньи), при передозировке препаратов, вследствие длительного вазоспазма развивается ишемия конечностей, что может привести к гангрене.

Алкалоиды спорыньи избирательно действуют на матку (α_1-АР и 5-HT_2), с возрастанием дозы наблюдаются увеличение тонуса и сильные сокращения матки. Поскольку при этом происходит механическое сдавление сосудов, то в послеродовом периоде алкалоиды спорыньи можно применять для остановки кровотечения (эффект развивается через несколько минут и длится 2 ч). В связи с увеличением числа α_1-АР в матке по мере развития беременности, её чувствительность к алкалоидам спорыньи в более поздние сроки беременности повышается.

В народной медицине алкалоиды спорыньи иногда используют для вызывания аборта. Хотя в принципе для ускорения родов препараты спорыньи непригодны, так как, вызывая сильные и некоординированные сокращения миометрия, они могут затруднять выход плода из полости матки и даже вызвать разрыв матки.

В современной медицине чаще используют дигидрированные производные алкалоидов спорыньи. Нежелательное действие на матку и сосудосуживающее действие эрготомина, эрготоксина и др. уменьшается путём изменения их структуры в ходе дигидрирования (частичного восстановления с присоединением 2 атомов водорода к ядру лизергиновой кислоты). Таким образом получаются дигидрированные производные, у которых меньше серотониновый и гладкомышечный (гладкие мышцы сосудов и матки) эффекты, но сильнее и избирательней α-адреноблокирующий эффект.

Дигидрированные алкалоиды спорыньи применяют также в составе целого ряда комбинированных готовых лекарственных препаратов (вазобрал, бринердин и др.).

Фентоламин в равной степени блокирует α_1- и α_2-АР. В тоже время он является агонистом мускариновых и H_1- и H_2-гистаминовых рецепторов. Уменьшает периферическое сопротивление, блокируя α_1- и α_2-АР. Частично, за счёт блокады α_2-пресинаптических адренорецепторов (при блокаде α_2-пресинаптических адренорецепторов увеличивается выброс НА в синаптическую щель, в том числе в β-адренергических синапсах) может стимулировать сердечную деятельность (выраженная тахикардия, аритмии, стенокардия).

Вещества, блокирующие α_1-адренорецепторы. Селективные α_1-адреноблокаторы (α_1-АБ) по сравнению с неселективными α-АБ обладают меньшим количеством и меньшей выраженностью побочных эффектов, так как не блокируют пре- и постсинаптические α_2-адренорецепторы.

Селективные α_1-АБ по избирательности действия на сосудистый тонус делятся на две основные подгруппы — вазоактивные и вазонеактивные препараты.

Вазоактивные селективные α_1-АБ (празозин, доксазозин, теразозин) блокируют α_1-АР как сосудов, так и предстательной железы.

Они обладают выраженными сосудорасширяющими свойствами, снижают артериальное давление и вызывают рефлекторную тахикардию, снижают преднагрузку на миокард.

Все селективные вазоактивные α_1-АБ оказывают положительное влияние на липидный обмен, не влияют на углеводный обмен и обмен мочевой кислоты.

Несмотря на то что селективные α_1-АБ обладают достаточно выраженным гипотензивным действием, их применение в качестве препаратов для лечения артериальной гипертензии, особенно у пожилых людей, в настоящее время ограничивается из-за таких побочных эффектов, как ортостатическая гипотензия, тахикардия и прогрессирование сердечной недостаточности. Тем не менее, они считаются полезными для мужчин с высоким артериальным давлением, страдающих доброкачественной гиперплазией предстательной железы.

α_1-АБ являются самыми популярными в мире препаратами для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ), что обусловлено их высокой эффективностью и быстротой развития клинического эффекта. Блокада α-АР приводит к расслаблению гладкой мускулатуры шейки мочевого пузыря, простаты и простатической части уретры, улучшению. При этом улучшается отток мочи (устраняется динамическая обструкция) Большинство α_1-АБ обладает сопоставимым клиническим действием в отношении ДГПЖ: уменьшают симптомы в среднем на 50–60%, снижают количество остаточной мочи примерно на 50%. α_1-АБ особенно эффективны у больных с болезненным мочеиспусканием, императивными позывами на мочеиспускание, при обструкции (нарушении оттока мочи) небольшой

или умеренной степени. Достоверного изменения объёма предстательной железы при лечении данными препаратами не зарегистрировано. При длительном приёме α_1-АБ симптоматическое улучшение и динамика объективных показателей обычно наблюдаются уже в первые недели их применения. Если положительного эффекта не удаётся достичь через 3 месяца терапии, дальнейшее использование лекарственных средств этой группы бесперспективно.

С учётом того, что из общего числа α_1-АР в предстательной железе человека 70% относится к подтипу α_{1A} (α_{1A}-АР участвуют в регуляции сокращения сокращений гладких мышц предстательной железы, а α_{1B}-АР — в регуляции сокращений гладких мышц сосудов), наиболее эффективны в лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы вазоактивные специфические α_{1A}-АБ (тамсулозин, теразозин, альфузозин).

Особенности действия и клинического применения отдельных препаратов

Вазоактивные α_1-адреноблокаторы. Празозин (адверзутен) появился первым из группы α_1-АБ.

Его сосудорасширяющее действие связано в первую очередь с сильной α_1-адреноблокирующей активностью (сродство к α_1-АР в 1000 раз выше, чем к α_2-АР) в отношении гладких мышц артериальных и венозных сосудов, что приводит к снижению повышенного артериального давления.

Назначается при артериальной гипертензии и ранних стадиях сердечной недостаточности, ДГПЖ. Начинают лечение с 1 мг 2–3 раза в сутки, первая доза может составлять 0,5 мг, лучше вечером, после чего больной должен полежать 2–3 ч (для профилактики ортостатической гипотензии как эффекта «первой дозы»).

К недостаткам празозина нужно отнести возможность развития эффекта «первой дозы» (резкое понижение АД, вплоть до ортостатического коллапса, после первого приёма), развитие ранней и поздней толерантности, сосудистые побочные эффекты (гипотензия, головокружение, потливость), диспепсические расстройства, двоение в глазах.

Доксазозин и теразозин считаются препаратами 2-го поколения. Отличительные свойства α_1-АБ 2-го поколения: пролонгированный эффект (если $t_{1/2}$ для празозина составляет 2–3 ч, то для теразозина и доксазозина — 12 и 20 ч соответственно); менее характерно развитие феномена «первой дозы»; более выражено метаболическое действие и улучшение уродинамики.

Доксазозин (камирен — структурный аналог празозина). Обладает гипотензивным, сосудорасширяющим, гиполипидемическим и спазмолитическим действием. Назначают обычно один раз в день. Вероятность развития ортостатической гипотензии меньше, чем у празозина. Выгодно отличается от празозина отсутствием изменений частоты сердечных сокращений (системное артериальное давление падает умеренно без возникновения рефлекторной тахикардии). Показано благоприятное влияние на гипертрофию левого желудочка у больных с артериальной гипертензией.

Теразозин (корнам) избирательно блокирует α_1-АР гладкой мускулатуры чревных сосудов, предстательной железы и шейки мочевого пузыря, в связи с чем расслабляет гладкую мускулатуру шейки мочевого пузыря и сократительные элементы простаты. Способствуя уменьшению дизурических явлений при аденоме, расширяет крупные резистивные сосуды и снижает ОПСС. Обладает гиполипидемическим действием. Применяется при артериальной гипертензии, аденоме предстательной железы, сердечно недостаточности в начальной стадии, гиперлипидемии. Применяется 1 раз в день. Может вызывать сонливость.

Вазонеактивные α_1-адреноблокаторы. Вазонеактивные препараты — тамсулозин и альфузозин. В связи с высокой селективностью (блокада подтипа α_{1A}-АР

и отсутствие блокады α_{1B}-АР сосудов) у них практически отсутствует вазодилатирующий эффект, вследствие чего на фоне их приёма не происходит снижения АД, в том числе и при его нормальных цифрах. Это позволяет свести к минимуму побочные эффекты. Оба препарата применяются только для лечения ДГПЖ.

Альфузозин (дальфаз) снижает давление в уретре и уменьшает сопротивление току мочи; облегчает мочеиспускание и устраняет расстройства мочеиспускания. В терапевтических дозах не влияет на α_1-адренорецепторы сосудистой стенки; поэтому применяется только при нарушениях мочеиспускания при ДГПЖ. Назначается по 5 мг 2 раза в день. Побочные действия (диспепсические явления, головная боль, головокружение, сонливость, слабость, тахикардия, ортостатическая гипотензия, отёки, кожные высыпания) вызывает редко. С осторожностью следует назначать пациентам с ишемической болезнью сердца (может ухудшать течение стенокардии).

Тамсулозин, как и альфузозин, имеет единственное показание — ДГПЖ. Тамсулозин проявляет селективность к различным α_1-адренорецепторам в следующем порядке $\alpha_{1A} > \alpha_{1D} > \alpha_{1B}$. Он в 20 раз более селективен к α_{1A} АР, чем к α_{1B}-АР. По сравнению с другими α_1-адреноблокаторами (празозин, доксазозин, альфузозин, теразозин) тамсулозин обладает наибольшей селективностью к α_{1A}-АР по сравнению с селективностью к α_{1B}-АР. Кроме того, большинство метаболитов тамсулозина являются эффективными антагонистами α_1-АР и сохраняют селективность к α_{1A}, относительно α_{1B}-АР. Поэтому тамсулозин обладает наиболее избирательным действием на адренорецепторы гладкой мускулатуры шейки мочевого пузыря и предстательной железы (подтип α_{1A}).

Принимают по 1 капсуле (0,4 мг) в день. Благодаря высокой селективности и отсутствию гипотензивного эффекта нет необходимости титрования дозы тамсулозина.

Побочные действия редки и менее выражены, чем при приёме теразозина и альфузозина. Как и альфузозин может вызывать ретроградную эякуляцию. С осторожностью препарат назначают пациентам с выраженными нарушениями функции печени.

Вещества, блокирующие α_2-адренорецепторы. Препараты, вызывающие блокаду α_2-адренорецепторов (α_2-АБ) редко используются в клинической практике.

Иохимбин (йохимбин) — алкалоид из коры западно-африканского дерева *Corynanthe yohimbe* и корней *Rauwolfia serpentine*. По структуре близок к резерпину. Иохимбин селективно блокирует центральные и периферические пресинаптические α_2-АР. За счёт центрального действия вызывает эффекты, противоположные действию α_2-агониста клонидина — повышает артериального давление и частоту сердечных сокращений. В больших дозах может блокировать постсинаптические α-АР. Иохимбин может улучшать сексуальную функцию, но научных доказательств этому пока недостаточно. Полагают, что улучшение эректильной функции возникает из-за усиления притока крови к половому члену и уменьшения оттока. За счёт центрального действия может повышать двигательную активность и настроение, усиливать тревожность.

2. *Вещества, блокирующие β-адренорецепторы.* β-адренергическая регуляция играет существенную роль в регуляции функционально-метаболических процессов в организме как в норме, так и при развитии патологических процессов при многих заболеваниях. Именно в силу этого обстоятельства β-адреноблокаторы (β-АБ) сегодня являются одной из наиболее часто используемых в клинической практике групп препаратов, которые при рациональном использовании повышают качество и продолжительность жизни больных, страдающих сердечно-сосудистыми и другими заболеваниями.

Фармакологическая активность β-АБ в основном определяется их способностью ослаблять или полностью устранять эффекты катехоламинов и β-адреномиметиков на β-АР.

Характер и выраженность фармакологических эффектов (лечебных и побочных) β-АБ зависят в первую очередь от их тропности к β-АР различного типа.

По избирательности блокирующего действия в отношении β-АР β-АБ делятся на 3 основные группы:

1) вещества, влияющие на β_1- и β_2-АР (неизбирательные, неселективные β-адреноблокаторы);

2) вещества, влияющие преимущественно на β_1-АР (избирательные, селективные β_1-адреноблокаторы);

3) вещества, влияющие преимущественно на β_2-АР (избирательные, селективные β_2-адреноблокаторы).

К неспецифическим β-АБ можно отнести и рассматриваемые выше в группе неспецифических адреноблокаторов (α- и β-АБ) — лабеталол, карведилол и др., у которых β-адреноблокирующая активность значительно преобладает над α-адреноблокирующей активностью.

Избирательность (селективность) β-АБ в отношении подтипа β-адренорецепторов дозозависима и снижается при их применении в больших дозах (например, β_1-АБ бисопролол при увеличении дозы до 20 мг и более начинает блокировать β_2-АР бронхов, сосудов и др.).

Кроме того, необходимо иметь в виду, что классификация тканей и органов по локализации β_1- или β_2-адренорецепторов довольно условна, так как в них обычно находятся адренорецепторы обоих типов с количественным преобладанием одного из них. Так, например, в сердце при абсолютном преобладании β_1-АР 20–40 % от общего количества β-адренорецепторов приходится на β_2-АР, а в лёгких, помимо основных β_2-АР, содержится 25–30 % адренорецепторов β_1-типа, что приводит к появлению нехарактерной реакции даже у селективных β-АБ.

Вещества, блокирующие β_1- и β_2-адренорецепторы

Вещества, блокирующие β_1-адренорецепторы. Учитывая, что области клинического использования неселективных β_1- и β_2-адреноблокаторов (β_1- и β_2-АБ) и селективных β_1- адреноблокаторов (β_1-АБ) во многом совпадают, их фармакологические свойства и клиническое применение будут рассматриваться в одном разделе.

Локализация типов и подтипов β-АР отличается в различных органах и тканях, и с учётом клинической значимости β-адреноблокирующего действия β-АБ подразделяют на две группы: кардиоселективные — ацебутолол, атенолол, метопролол, талинолол и др. и некардиоселективные — пропранолол (анаприлин), альпренолол, окспренолол, пиндолол, надолол, соталол и др.

В отличие от некардиоселективных препаратов, действующих одновременно на β_1-АР сердца и β_2-АР других органов, кардиоселективные β-АБ, блокируя β_1-АР сердца, не влияют на органы, в которых локализованы β_2-АР, т. е. на сосуды, гладкие мышцы бронхов, матку, поджелудочную железу и др.

К кардиоселективным препаратам, применяемым для лечения артериальной гипертонии и ишемической болезни сердца (ИБС), относится и небиволол (небилет), который конкурентно и избирательно блокирует синаптические и внесинаптические β_1-АР и, кроме того, модулирует высвобождение эндотелиального вазодилатирующего фактора (NO).

Кроме избирательности в отношении β-АР отдельные β-АБ могут обладать α-адреноблокирующей и внутренней симпатомиметической активностью, влияющей на их фармакологические свойства.

Наряду с β-адреноблокирующей активностью некоторым β-АБ (лабеталол, деливалол, ацебутолол, целипролол) присуща α-адреноблокирующая активность, снижающая периферическую вазоконстрикцию, характерную для β-АБ. Часть из них (деливалол, целипролол) обладает выраженной селективной β_2-адреномиметической активностью. Эти свойства связаны с присутствием в структуре препаратов нескольких стереоизомеров, обладающих различными видами активности.

Сосудорасширяющее действие обусловлено наличием у данных β-АБ сопутствующих α-адреноблокирующих и/или β_2-адреномиметических и/или прямых вазодилатирующих (миотропных) эффектов. Наличие β_2-адреномиметической активности уменьшает вероятность бронхоспазма, гиперлипидемии, гипергликемии, снижения почечного кровотока при приёме препарата. Сочетание β-блокирующего и периферического вазодилатирующего действия обеспечивает выраженный гипотензивный эффект.

Фармакологическая активность и клиническое применение отдельных препаратов из этой группы рассматривались ранее в разделе «Вещества, блокирующие α- и β-адренорецепторы».

За счёт внутренней симпатомиметической активности (ВСА) отдельные адреноблокаторы при связывании с адренорецептором, помимо основного блокирующего действия на адренорецепторы, могут оказывать на них некоторое стимулирующее влияние, активируя при этом аденилатциклазу. Их стимулирующий эффект на адренорецепторы значительно слабее, чем у норадреналина, адреналина или изопротеренола.

Наибольшей ВСА обладают пиндолол, альпренолол и окспренолол, менее выражена она у ацебутолола и атенолола и отсутствует у пропранолола, метопролола, надолола, соталола и др.

Препараты с ВСА в меньшей степени замедляют частоту сердечных сокращений, снижают сердечный выброс, влияют на общее периферическое сопротивление (благодаря частичной стимуляции β-адренорецепторов), обладают атерогенной активностью. Препараты с внутренней симпатомиметической активностью показаны при брадикардии.

Если длительная стимуляция β-АР ведёт к снижению их плотности на мембранах клеток (феномен даун-регуляции), то их угнетение приводит к повышению плотности (феномен ап-регуляции). При длительном приёме β-АБ, но иногда и через несколько дней терапии (2–3 дня) возникает синдром отмены. Обычно он возникает через 1–2 дня после резкого прекращения приёма, достигает наибольшей выраженности с 4-е по 8-е сутки и заканчивается через 1,5–2 недели. В его основе лежит увеличение числа β-АР на клеточных мембранах, возникающее как компенсаторная реакция на уменьшение стимулирующего влияния КА на β-АР при их блокаде (феномен ап-регуляции), и высвобождение НА из симпатических нервов после снятия блокады пресинаптических β_2-АР. Плотность мембранных β-адренорецепторов остаётся пониженной в течение нескольких дней после полной элиминации β-адреноблокатора из крови. В результате повышается чувствительность сердца к симпатоадреналовым влияниям. В крови увеличивается уровень трийодтиронина.

Проявляется синдром отмены в появлении беспокойства, дрожи в теле, внезапном повышении давления, учащении сердечных сокращений и приступов стенокардии, отрицательной динамике ЭКГ. Наиболее тяжёлые последствия синдрома отмены — инфаркт миокарда и внезапная смерть. Для его предотвращения препарат отменяется постепенно в течение 10–14 дней (доза препарата постепенно уменьшается и увеличивается интервал между приёмами). Препараты, обладающие ВСА (как селективные, так и неселективные) могут снижать количество β-АР на мембранах клеток, уменьшая вероятность развития синдрома отмены.

Отдельные β-АБ обладают мембраностабилизирующей активностью (местноанестезирующий и антиаритмический эффект) (пропранолол, окспренолол, ацебутолол и др.). Мембраностабилизирующее действие не связано с влиянием β-АБ на адренорецепторы. Оно проявляется в дозах, значительно превышающих терапевтические, и является следствием блокады натриевых и калиевых каналов в нейронах и мышечных клетках.

Большое значение для проявления фармакологической активности имеют физико-химические свойства β-АБ, в частности степень липофильности (жирорастворимости) или гидрофильности (водорастворимости) препаратов. Липофильность определяет длительность действия β-АБ и их способность проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Липофильные средства (пропранолол, метопролол, окспренолол, бисопролол) быстро и практически полностью всасываются в ЖКТ, быстро метаболизируются в печени, причём большая часть принятой дозы разрушается при первом же прохождении через печень, имеют большие объёмы распределения и хорошо проникают через ГЭБ. Из-за активного метаболизма в печени липофильные β-АБ имеют более низкую биодоступность. Поэтому их принимают 3–4 раза в сутки. Проникая через гематоэнцефалический барьер, они связываются с β-АР мозга, вызывая при длительном приёме головную боль, сонливость, депрессию, галлюцинации.

Гидрофильные β-АБ (ацебутолол, атенолол, надолол, соталол, бетаксолол, картеолол, эсмолол) всасываются хуже, метаболизируются медленнее, и их период полужизни ($t_{1/2}$) длиннее, плохо проникают через ГЭБ. Поэтому водорастворимые препараты можно принимать 1–2 раза в сутки. Наиболее выраженными гидрофильными свойствами обладает надолол (коргард).

При нарушении функции печени удлиняется $t_{1/2}$ липофильных β-АБ, а при нарушении функции почек — водорастворимых. На этом основан выбор средств данной группы у больных с печёночной и почечной недостаточностью.

Несмотря на то что водорастворимые препараты хуже проникают через гематоэнцефалический барьер, центральные эффекты (сонливость, заторможенность, депрессия, галлюцинации) описаны не только у жирорастворимых, но и у водорастворимых β-АБ.

Блокада β-адренорецепторов приводит к снижению активности аденилатциклазы и синтеза цАМФ, уменьшается его активирующее влияние на протеинкиназы, что тормозит зависимое от протеинкиназ фосфорилирование кальциевых каналов и уменьшает приток кальция внутрь клетки в период индуцированной деполяризации. Это в свою очередь приводит к снижению кальций-зависимого выхода ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и уменьшению его концентрации внутри клетки. В результате активность сердца снижается и развиваются отрицательные ино-, хроно-, дромо- и батмотропный эффекты.

При применении β-АБ частота сердечных сокращений (ЧСС) обычно снижается. Из-за наличия внутренней симпатомиметической активности пиндолол и ацебутолол несколько увеличивают ЧСС. При снижении ЧСС и силы сердечных сокращений снижается и потребление миокардом кислорода. Общее периферическое сопротивление сосудов и сосудистое сопротивление в почках увеличиваются. Это связано с усилением сосудосуживающего действия эндогенных катехоламинов, взаимодействующих с α_1-АР (в сосудах находятся сосудосуживающие α_1-АР и сосудорасширяющие β_2-АР) на фоне блокады β-АР сосудов.

Риск увеличения общего периферического сопротивления сосудов уменьшается при введении селективных α_1-АБ метопролола, атенолола и бетаксолола.

Метаболические эффекты β-адреноблокаторов. β-АБ оказывают сложное влияние на углеводный обмен. Они уменьшают синтез инсулина и глюкагона (основной

гормон, повышающий уровень глюкозы в крови), тормозят гликогенолиз в печени. β-АБ блокируют гипергликемическое действие катехоламинов в организме.

У больных с неинсулинзависимым сахарным диабетом назначение β-АБ приводит к усилению гипергликемии. Блокируя β_2-АР β-клеток поджелудочной железы, β-АБ уменьшают секрецию инсулина и повышают базальный уровень глюкозы.

У больных с инсулинзависимым диабетом увеличивается риск возникновения гипогликемии в связи с нарушением образования глюкозы при гипогликемии. При этом «выход» из гипогликемии затруднён из-за торможения распада гликогена в печени до глюкозы. Кроме того, нередко наблюдается резкий подъём АД, так как выброс КА, посредством которого организм стремится повысить уровень глюкозы крови, при блокаде β_2-АР сосудистой стенки вызывает прессорную реакцию, опосредованную через стимуляцию α-АР сосудов. По этим причинам β-АБ не назначают больным с инсулинзависимым сахарным диабетом.

β-АБ угнетают стимуляцию липолиза симпатической нервной системой и липолитическое действие катехоламинов. Блокада β_1-АР в жировой ткани приводит к угнетению липолиза.

Длительное применение неселективных β-АБ (например, пропранолола) приводит к повышению уровня холестерина ЛПОНП и триглицеридов в сыворотке и незначительно понижает уровень холестерина ЛПВП. Уровень общего холестерина и холестерина ЛПНП существенно не изменяется. При этом часто снижается соотношение холестерин ЛПВП/холестерин ЛПНП, что повышает вероятность сосудистых поражений. Селективные α_1-АБ в меньшей степени влияют на содержание ЛПВП. Препараты, обладающие внутренней симпатомиметической активностью, не увеличивают концентрацию триглицеридов; возможно небольшое, но стойкое увеличение содержания ЛПВП. Мощные селективные α_2-адреномиметики при достаточной концентрации в крови также повышают содержание ЛПВП. Для сравнения, α_1-АБ (празозин) всегда повышают содержание ЛПВП и снижают концентрацию триглицеридов в сыворотке, что является благоприятным признаком. Иногда незначительно снижаются уровни общего холестерина и холестерина ЛПНП.

В то же время результаты недавних рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследований (BCAPS, ELVA) показали наличие у одного из β-адреноблокаторов (метопролол сукцинат — метопролол CR/XL) при длительном приёме благоприятного влияния на ранние стадии развития атеросклероза. Наличие антиатеросклеротического действия у метопролола CR/XL было отмечено и в экспериментах на животных. Противоатеросклеротическое действие метопролола связывают со снижением центральной симпатической импульсации (в эксперименте норадреналин оказывает атерогенное действие, которое уменьшается при симпатэктомии), гемодинамическими эффектами, развивающимися при блокаде периферических β_1-АР (уменьшение ЧСС, АД), что уменьшает повреждающее влияние гемодинамических факторов на сосуды, в частности на эндотелий, уменьшением адгезии тромбоцитов в области бифуркации сонной аорты, уменьшением связывания липопротеидов низкой плотности с протеингликанами сосудистой стенки и др.

Бронхиальная астма и хронические обструктивные заболевания лёгких (ХОБЛ) являются противопоказанием к назначению β-адреноблокаторов, так как при применении β-АБ сопротивление дыхательных путей возрастает. Неселективные β-АБ могут вызвать бронхоспазм. Селективные β_1-АБ (в бронхах преобладают β_2-АР) реже вызывают бронхоспазм, хотя у некоторых больных даже низкие дозы этих препаратов увеличивают сопротивление дыхательных путей. Метопролол CR/XL является единственным β-адреноблокатором, не имеющим зарегистрированных противопоказаний — бронхиальная астма и ХОБЛ.

При приёме β-АБ может ухудшаться функция почек за счёт снижения сердечного выброса, скорости клубочковой фильтрации и почечного кровотока, частично от блокады β_2-АБ в сосудах почек. Значительное снижение почечного кровотока может иметь место при отсутствии гипотензивного эффекта во время приёма неселективных β-АБ. Негативное влияние на почки слабее или отсутствует у кардиоселективных β-АБ или при наличии ВСА. β-Адреноблокаторы за счёт блокады β-АР почек (в основном β_1-подтипа) подавляют секрецию ренина, которая активируется симпатической нервной системой, что приводит к снижению АРП.

Применение β-АБ за счёт блокады β_2-АР, вызывающих расслабление матки, приводит к повышению её сократительной активности.

4.3.2. Антиадренергические средства непрямого типа действия (симпатолитики). Антиадренергические средства непрямого типа действия (симпатолитики) — это вещества, угнетающие передачу нервных импульсов в адренергических синапсах за счёт уменьшения концентрации НА в синаптической щели.

Препараты этой группы не влияют на адренорецепторы, а действуют на обмен катехоламинов в области пресинаптической мембраны нервных окончаний, блокируя передачу нервных импульсов в адренергических синапсах за счёт истощения запасов НА в окончаниях симпатических волокон, что приводит к уменьшению количества медиатора норадреналина, выделяющегося в синаптическую щель в ответ на нервные импульсы.

Другими словами, симпатолитики — это вещества, уменьшающие влияние НА на адренорецепторы за счёт снижения концентрации медиатора в синаптической щели.

Симпатолитики могут уменьшать концентрацию медиатора в синаптической щели за счёт различных механизмов, влияя на выброс медиатора, обратный захват, депонирование в синаптических пузырьках и др., снижая таким образом концентрацию НА в синаптической щели ниже порогового уровня, необходимого для активации адренорецепторов.

В отличие от адреналитиков прямого типа действия, блокирующих влияние как эндогенных катехоламинов — А и НА, так и экзогенно введённых адреномиметиков, симпатолитики блокируют эффекты только эндогенного медиатора (НА), выделяющегося в ответ на нервный импульс. На фоне этих веществ активность адреномиметиков прямого типа действия может даже возрасти, а адреномиметиков непрямого типа действия (эфедрин, фенамин) снизиться.

Основной недостаток симпатолитиков — медленное развитие эффекта и длительное выключение симпатической иннервации, что приводит к преобладанию парасимпатических влияний в организме (брадикардия, усиление перистальтики кишечника вплоть до поноса, возникновение тошноты, рвоты и др.).

Применяют симпатолитики в основном для снижения артериального давления при гипертонии.

4.4. Заключение

В процессе эволюции на плазматических мембранах клеток практически всех тканей и органов человека сформировались адренорецепторы как генетически детерминированные белковые образования. Несмотря на то что в настоящее время установлены 9 подтипов адренорецепторов: α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, α_{2A}, α_{2B}, α_{2C}, α_1, α_2, α_3, избирательных агонистов и антагонистов для всех них ещё не создано. Функция адренорецепторов заключается в специфическом узнавании, связывании молекул адреналина и норадреналина и передачи полученных от них молекулярных сигналов на различные биоструктуры клетки. Адренорецепторы — конформационно лабильные

структуры. Их способность специфически связывать лиганды и трансформировать полученный сигнал зависит от присутствия или отсутствия одно- и двухвалентных ионов, циклических нуклеотидов и других низкомолекулярных соединений. Число адренорецепторов одного класса, соотношение между классами и подклассами адренорецепторов, сопряжение адренорецепторов с определяющими их функциональную активность ферментами и другими регуляторными структурами в клетках могут меняться в процессе дифференцировки ткани, а также при изменении гормонального фона и воздействии различных физиологических и патологических факторов. Созданы и часто с успехом применяются ЛВ с избирательной тропностью к определённому виду адренорецепторов для лечения ряда заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной и других систем.

С практической точки зрения исследования по адренорецептологии следует вести в следующих направлениях.

1. Поиск новых избирательных агонистов и антагонистов различных видов адренорецепторов и изучение механизмов их действия.

2. Поиск и анализ возможного использования в клинике ЛВ, взаимодействующих не с катехолсвязывающими участками адренорецепторов, а с другими структурами, так или иначе влияющими на функционирование адренореактивных систем.

3. Выявление возможной корреляции между функциями адренорецепторов клеток крови с функциями адренорецепторв органов и тканей с целью поиска объективных способов оценки на молекулярном уровне функции того или иного вида адренорецепторов в организме, как для диагностики, так и проверки эффективности лечения с помощью адренергических средств.

4. Поиск других способов тестирования функции адренорецепторов у человека.

Решение перечисленных задач должно помочь разработать научно обоснованные методы лечения адренергическими веществами таких болезней века, как гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда, бронхиальная астма и др.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 4

1. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М.–Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.
2. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. — 384 с.
3. *Lefkowitz R.J.* Seven transmembrane receptors: something old, something new // Acta Physiol. 2007. V. 190. P. 9–19.
4. *Guimarães S., Moura D.* Vascular Adrenoceptors: An Update // Pharmacol. Rev. 2001. V. 53. P. 319–356.
5. *Frielle T., Daniel K.W., Caron M.G. et al.* Structural basis of [beta]-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric [beta]1/[beta]2-adrenergic receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9494–9498.
6. *Rasmussen S.G.F., Choi H.-J., Rosenbaum D.M. et al.* Crystal structure of the human [beta]2 adrenergic G-protein-coupled receptor // Nature. 2007. V. 450. P. 383–388.
7. *Lefkowitz R.J., Rajagopal K., Whalen E.J.* New roles for [beta]-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors // Mol. Cell. 2006. V. 24. P. 643–652.
8. *Frishman W.H.* [alpha]- and [beta]-adrenergic blocking drugs // In: Cardiovascular Pharmacotherapeutics Manual. 2nd ed. / Ed. W.H. Frishman, E.H. Sonnenblick, D.A. Sica. — N.Y.: McGraw Hill, 2005. P. 19–57.
9. *Frishman W.H., Sica D.A.* [beta]-Adrenergic blockers // In: Hypertension Primer. The Essentials of High Blood Pressure / Ed. J.L. Jr. Izzo, D. Sica, H.R. Black. 4th ed. — Philadelphia, PA: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 2008. P. 446–450.
10. *Wisler J.W., DeWire S.M., Whalen E.J. et al.* A unique mechanism of [beta]-blocker action: carvedilol stimulates [beta]-arrestin signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 16657–16662.
11. *Carlberg B., Samuelsson O., Lindholm L.H.* Atenolol in hypertension: is it a wise choice? // Lancet. 2004. V. 364. P. 1684–1689.
12. *Cutler J.A., Davis B.R.* Should [beta] blockers and diuretics remain as first-line therapy for hypertension? // Circulation. 2008. V. 117. P. 2691–2705.
13. *Sarafidis P., Bogojevic Z., Basta E. et al.* Comparative efficacy of two different [beta] blockers on 24-hour blood pressure control // J. Clin. Hypertens. 2008. V. 10. P. 112–118.
14. *Young R.R., Growdon J.H., Shahani B.T.* Beta-adrenergic mechanisms in action tremor // N. Engl. J. Med. 1975. V. 293. P. 950–953.
15. *Heusch G., Baumgart D., Camici P. et al.* α-adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans // Circulation. 2000. V. 101. P. 689–694.
16. *Brodde O.E., Bruck H., Leineweber K.* Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance // J. Pharmacol. Sci. 2006. V. 100. P. 323–337.
17. *Barbato E., Piscione F., Bartunek J. et al.* Role of β_2-adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries // Circulation. 2005. V. 111. P. 288–294.
18. *Iaccarino G., Ciccarelli M., Sorriento D. et al.* Ischemic neoangiogenesis enhanced by β_2-adrenergic receptor overexpression. A novel role for the endothelial adrenergic system // Circ. Res. 2005. V. 97. P. 1182–1189.
19. *Hein T.W., Zhang C., Wang W. et al.* Across the left ventricular wall heterogeneous β_2-adrenoceptor expression and dilation in coronary arterioles // Circulation. 2004. V. 110. P. 2708–2712.
20. *Baumgart D., Ehring T., Kowallik P. et al.* Impact of alpha-adrenergic coronary vasoconstriction on the transmural myocardial blood flow distribution during humoral and neuronal adrenergic activation // Circ. Res. 1993. V. 73. P. 869–886.
21. *Baumgart D., Naber C., Haude M. et al.* G protein b3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on α_2-adrenoceptor activation // Circ. Res. 1999. V. 85. P. 965–969.
22. *Dishy V., Sofowora G.G., Xie H.G. et al.* The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization // N. Engl. J. Med. 2001. V. 345. P. 1030–1305.

Глава 5

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Гистамин относится к наиболее старым биогенным аминам, история изучения которого начинается с 1907 г., когда Виндаус и Фогт синтезировали его из имидазолпропионовой кислоты. Первая работа, посвящённая изучению биологической активности гистамина появилась в 1910 г. (H. Dale и др., 1910). Только через 26 лет после этого был синтезирован антагонист гистамина, который способствовал идентификации гистаминового рецептора (D. Bovet и A. Staub, 1936).

В связи с тем, что антигистаминный препарат мепирамин не обладает способностью блокировать действие гистамина на желудочную секрецию и частоту сокращений сердца, A. S. Ash и H. Schild (1966) выдвинули гипотезу о существовании более чем одного класса рецепторов гистамина.

Согласно определению A. S. Ash и H. Schild, рецепторы гистамина, которые опосредуют его эффекты и функция которых подавляется мепирамином, представляют собой H_1-рецепторы, а те рецепторы гистамина, на которые не влияет мепирамин, не являются H_1-рецепторами.

В 1972 г. J. H. Black и др. удалось синтезировать антигистаминный препарат буримамид, который мог конкурентно ингибировать секреторный эффект гистамина в желудке, что послужило решающим экспериментальным доказательством существования второго типа гистаминовых рецепторов, названных H_2-рецепторами. В последствии оказалось, что буримамид является более селективным антагонистом ещё одного типа гистаминовых рецепторов — H_3-рецепторов, локализованных в ЦНС, периферических нервах, эндотелии, энтерохроминных клетках и принимающих участие в регуляции высвобождения нейромедиаторов, релаксации сосудов, ингибировании желудочной секреции. Для H_2-рецепторов были синтезированы другие специфические антагонисты — циметидин, ранитидин, фамотидин, нашедшие широкое применение в клинической практике в качестве противоязвенных препаратов [1, 2].

Существование различных гистаминовых рецепторов в различных органах и тканях млекопитающих было неоднократно доказано при проведении фармакологических и биохимических экспериментов, что подтверждает наше предположение, сделанное несколько лет назад, о возможности появления других типов на том основании, что существуют некоторые экспериментальные факты (например, проявления седативного действия H_1-антагонистов, гипотензивного действия клонидина и антидепрессивной активности трициклических антидепрессантов), которые нельзя объяснить с помощью существующих типов гистаминовых рецепторов [3].

Гистамин представляет собой дихлоргидрат β-имидазолилэтиламина ($C_5H_9N_3$). Его молекулярная масса равна 111,1.

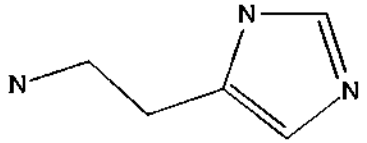
Молекула гистамина имеет три неравноценных атома азота, которые различаются между собой величиной заряда. Эти атомы азота попеременно могут заряжаться положительно, образуя катионные головки. В молекуле гистамина выделяют две группы с основными свойствами:

1) алифатический амин с основными свойствами;

2) два атома азота имидазольного кольца, которые функционируют как единая группа за счёт резонанса.

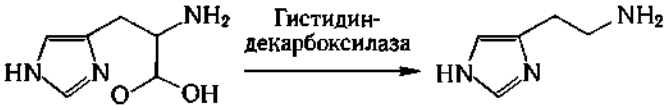
В физиологических условиях молекула гистамина вследствие резонанса может существовать в 3 формах.

Согласно биохимической номенклатуре, атом азота имидазольного кольца гистамина, прилежащий к боковой цепи, обозначается как *pros*-атом азота (N), или «пиридиновый», а противолежащий — как *tel*-атом азота (N), или «пиррольный»:



5.1. Биосинтез и метаболизм гистамина

Источником образования гистамина в животном организме является незаменимая аминокислота гистидин. Изменения последней в процессе метаболизма осуществляется по двум направлениям: а) гидролитическое дезаминирование при помощи фермента гистидазы (с отщеплением аммиака и образованием уроканиновой кислоты, которая под действием фермента урокиназы распадается до глутаминовой и муравьиной кислот); б) декарбоксилирование гистидина, катализируемое ферментом гистидиндекарбоксилазой с образованием гистамина (амина гистидина). Кофактором гистидиндекарбоксилазы в большинстве случаев является пиридоксаль-5-фосфат (витамин B_6):



Гистидин Гистамин

5.1.1. Депонирование и высвобождение гистамина. Почти все органы человека и животных содержат гистамин, но количество его сильно варьирует в различных тканях и у разных видов животных. На основании функциональных и морфологических различий депо гистамина в организме разделяют на два типа: тучноклеточные и не тучноклеточные. Тучные клетки были открыты Эрлихом в 1877 г. и названы им так вследствие наличия в их цитоплазме гранул с веществом, окрашивающимся метахромотически толуидиновым синим.

В настоящее время тучные клетки правильно называть тканевыми базофилами, а лейкоциты крови, также несущими в своих гранулах гистамин, — базофильными гранулоцитами крови [3].

Цитохимический анализ позволил обнаружить, что гранулы тучных клеток в большом количестве содержат белок (60%), гепарин (30%), и гистамин (10%), а также серотонин (0,3%), АТФ (0,2%), гиалуроновую и хондроитинсерную кислоту, липиды, РНК. Обнаружено, что гистамин в гранулах связан с гепарин-белковым комплексом, который действует как ионосвязывающая система.

В желудочно-кишечном тракте, главным образом в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишке, где синтезируется большая часть всего гистамина организма, примерно 60% всех его запасов локализовано в специфических клеточных депо и только 20% в тучных клетках обычного типа. Кроме слизистой оболочки

желудка к специфическим тканевым депо относят клетки, содержащие гистамин в поджелудочной железе и в нервной системе.

Находясь в связанном состоянии в тучных клетках, гистамин не активен. В физиологических условиях небольшое количество гистамина постоянно освобождается в тканях и органах, участвуя в нейрогуморальной регуляции капиллярного кровообращения, проницаемости стенок капилляров и клеточных мембран, в поддержании тонуса органов с гладкой мускулатурой.

Однако в условиях действия многих факторов (высокая и низкая температура, боевые отравляющие вещества типа фосгена, болевое раздражения, гипоксия, проникающая радиация, гипотонический «шок», микробные токсины, реакция антиген–антитело) имеет место освобождение большого количества гистамина и он превращается в фактор патологического значения.

Высвободители или «либераторы» гистамина можно классифицировать следующим образом:

1) вещества, сенсибилизирующие организм (антигена и вещества, образующие с белками тканей и органов антигены);

2) вещества, повреждающие структуру тканей (яды змей, бактериальные токсины);

3) протеолитические ферменты (трипсин);

4) поверхностно-активные вещества (соли желчных кислот);

5) высокомолекулярные вещества (яичной белок, декстран, поливинил-пирролидон, лошадиная сыворотка, «анафилатоксин»);

6) специальные освободители гистамина (вещество 48/80);

7) монооснования (алкиламины).

Гистаминвысвобождающие вещества представлены двумя группами:

1) низкомолекулярные вещества щелочной природы (моноамины, диамины, замещённые ароматические амины, аммиак, α-тубокурарин, морфин);

2) высокомолекулярное вещества — декстран (у крыс), поливинилпирролидон (у собак), полимиксин 3, протеолитические ферменты, яды змей, бактериальные токсины, вещество 48/80, комплекс антиген–антитело.

По механизму действия освободители гистамина разделяют на избирательные (нецитотоксические) и неизбирательные (цитотоксические).

Вещества первой группы: вещество 48/80, комплекс антиген–антитело, некоторые полипептиды с основными свойствами, вызывают высвобождение гистамина без разрушения тучных клеток. Об этом свидетельствует сохранение целостности мембран тучных клеток и отсутствие выхода плазматических включений и ионов K^+ из них при высвобождении гистамина, вызываемого специфическими антигенами.

Выделение гистамина — энергозависимый процесс, сопровождаемый усилением метаболизма экзогенной глюкозы и повышением потребления кислорода, а также увеличением окисления пирувата, выделения углекислого газа и уменьшением содержания клеточного АТФ. Важно отметить, что, каким бы способом (цитотоксическим или нецитотоксическим) не достигался контакт внеклеточных катионов с гранулярным матриксом тучных клеток, снятие гистамина с этого матрикса осуществляется по катионобменному механизму.

Блокирование окислительно-восстановительных процессов в суспензии перитонеальных тканевых базофилов актиномицином А приводит к уменьшению содержания в них АТФ, что сопровождается потерей способности клеток выделять гистамин при воздействии препарата 48/80.

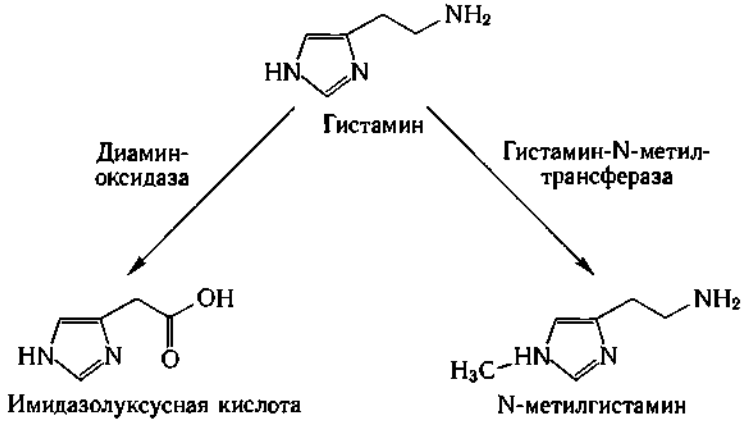
Центральное место в механизмах внутриклеточной регуляции выброса гистамина имеет цАМФ и цГМФ. Снижение содержания цАМФ служит пусковым механизмом секреторного процесса в тканевых базофилах и предшествует освобождению

гистамина. Изопротеренол, простагландин E_2, теофиллин и аденозин увеличивают концентрацию цАМФ в клетках и тормозят выброс гистамина. цГМФ, в отличие от цАМФ, стабилизирует полимеризацию микротрубочек в клетке и тем самым усиливает секрецию гистамина. Механизм действия нуклеотидов на сборку микротрубочек опосредован процессом фосфорилирования и дефосфорилирования. Синтетические препараты кромоглициновая кислота, кетотифен, цетиризин, производное аскомицина пимекролимус обладают противоаллергической и противовоспалительной активностью благодаря ингибированию высвобождения гистамина и других медиаторов из тучных клеток. Пимекролимус подавляет синтез интерлейкинов 2,4,10, активацию Т-лимфоцитов, предотвращает антиген-опосредованное высвобождение цитокинов и медиаторов воспаления из тучных клеток. При местном накожном применении близок по активности к глюкокортикоидам, но не вызывает атрофии кожи.

5.1.2. Пути инактивации гистамина в организме. Вновь синтезированной или высвобожденный из депо гистамин может подвергаться инактивации, которая заключается в ферментативном разрушении, обратном депонировании в тканях, или связывании с белками крови.

Основными реакциями ферментативного превращения гистамина являются окислительное дезаминирование и метилирование. Фермент ткани почек и слизистой оболочки желудка животных, инактивирующий гистамин, назвал гистаминазой.

Второй основной путь метаболизма гистамина заключается в метилировании гетероцикла гистамина с помощью фермента гистамин-N-метилтрансферазы. У млекопитающих этот фермент присутствует в нервной ткани и в большинстве органов:



К одному из механизмов нейтрализации свободного гистамина в крови относится связывание его с белками плазмы крови здоровых людей и животных.

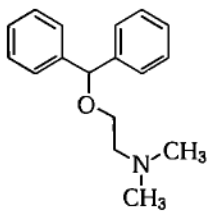
Это явление было впервые описано под названием гистаминопектической функции сыворотки крови Парро и Лаборда в 1969 г.

5.2. Агонисты и антагонисты гистаминовых рецепторов

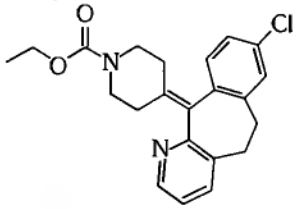
После открытия гистамина было синтезировано более тысячи новых соединений, близких к его структуре. Однако лишь у некоторых из них была выявлена способность избирательно взаимодействовать с гистаминовыми рецепторами. Часть агонистов и антагонистов используется только в экспериментах для изучения распределения гистаминовых рецепторов в организме и для анализа строения этих рецепторов; другая часть широко используются или начинают использоваться в клинике.

Химическая структура избирательных лигандов гистаминовых рецепторов приведена ниже:

H_1-рецептор



Дифенгидрамин

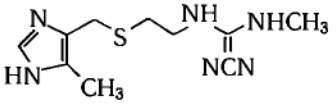


Лоратадин

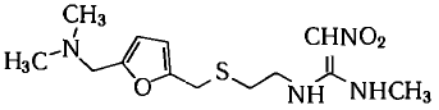


Гистамин

H_2-рецептор

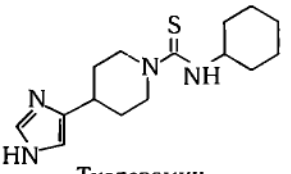


Циметидин

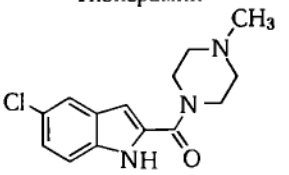


Ранитидин

H_4-рецептор



Тиоперамин



JNJ7777120

Для веществ, имеющих избирательность к H_1-рецепторам, характерно наличие заряженной аммонийной группы, а для веществ, селективно взаимодействующих с H_2-рецепторами — имидазольного кольца. H_1-антагонисты имеют липофильные арильные или тетраарильные кольца, которые отличаются от имидазольного кольца, но, подобно гистамину, они имеют боковую цепь (обычно аммониевую), которая при физиологических значениях pH заряжена положительно. В то же время H_2-антагонисты гидрофильны. Их сходство с гистамином заключается в том, что в их структуру входит имидазольное кольцо (оно может быть модифицировано и содержать заместители). Отличаются же они от гистамина тем, что имеют хотя и полярную, но не заряженную боковую цепь. Возможно, что отсутствие у них гистаминмиметической активности связано именно с незаряженностью боковой цепи. В кристаллической форме метиамид и циметидин образуют десятичленное кольцо благодаря установлению внутримолекулярной водородной связи между положительно заряженным атомом азота имидазольного кольца и наиболее удалённой NH-группой боковой цепи. R. C. Litchell (1980) методом инфракрасной спектроскопии показал, что в растворе эти вещества также могут образовывать внутримолекулярные водородные связи и иметь более компактную конформацию.

Следует отметить, что избирательный антагонист H_1-рецепторов ААН при фотолизе необратимо связывается с этими рецепторами, что позволяет использовать его в идентификации связывающего участка H_1-рецепторов и изучении их физико-химических свойств. В 1983 г. J.C. Schwartz и др. обнаружили наличие ещё одного гистаминного рецептора — H_3, находящегося в пресинаптической части гистаминергических нейронов и других нейронов. Иными словами, H_3-рецепторы могут быть ауто- и гетерорецепторами, регулируя по отрицательной обратной связи высвобождение как самого гистамина, так и других нейромедиаторов (норадреналина, дофамина, ацетилхолина) в ЦНС. H_3-рецепторы сопряжены с G_i/G_o-белком. Установлено, что H_3-рецепторы принимают участие в регуляции памяти и сна. Лиганды, имеющие тропность к этим рецепторам, могут оказаться эффективными для лечения ожирения, эпилепсии и дисфункции миокарда. Анагонисты H_3-рецепторов тиоперамид и клобенпропит улучшают когнитивную деятельность. Позднее были обнаружены H_4-рецепторы, имеющие гомологию на 35% с H_3-рецепторами. H_4-рецептор — это белок, состоящий из 390 аминокислотных остатков, образующих 7 трансмембранных областей. H_4-рецепторы относятся, так же как и H_3-рецепторы, к рецепторам, сопряжённым с G-белками. Экспрессируются H_4-рецепторы в гемопоэтических клетках — эозинофилах, тучных клетках, базофилах, дендритных клетках кожи и Т-лимфоцитах. H_4-рецепторы опосредуют хемотаксис эозинофилов, который можно ингибировать тиоперамидом. Гистамин может индуцировать вход кальция в тучные клетки посредством H_4-рецепторов. H_4-рецепторы могут играть роль в воспалении и развитии аутоиммунных заболеваний [4–7].

Все гистаминовые рецепторы сопряжены с G-белками. Их активация сопровождается мобилизацией кальция и повышением уровня цАМФ. В тучных клетках активация H_4-рецепторов сопровождается активацией фосфолипазы С и последующим выходом кальция из эндоплазматического ретикулума [8–14].

5.3. Топография гистаминовых рецепторов

В настоящее время установлено, что гистамин, наряду с другими медиаторными веществами и гормонами, практически повсеместно регулирует тонус неисчерченных мышц, действует как посредник на париетальные клетки желудка, выполняет роль синаптического медиатора и принимает участие в иммуно-химических механизмах [2]. Фармакологическая дифференциация рецепторов, опосредующих те или иные эффекты гистамина, основана на анализе конкуренции между антагонистами и агонистами гистаминовых рецепторов, определяемой по сдвигу кривых доза–эффект. В результате такого подхода получены сведения о типах гистаминовых рецепторов в различных органах и тканях [15–86].

5.3.1. Гистаминовые рецепторы ЦНС. Гистамин в головном мозге находится, по крайней мере, в двух видах клеток: нейронах и тканевых базофилах (тучные клетки). Функция гистамина тканевых базофилов ЦНС ещё не изучена, однако известно, что нейрональный гистамин выполняет нейромедиаторную роль. Считается, что ингибирование электрической активности нейронов коры головного мозга при ионофоретической аппликации гистамина опосредовано H_2-рецепторами, а тахикардия и гипертензия, развивающиеся после введения гистамина в желудочки головного мозга, — H_1-рецепторами.

Рвота, вызываемая гистамином у собак, опосредована H_1- и H_2-рецепторами головного мозга. При введении гистамина внутрь желудочков головного мозга крыс наблюдается гипогликемия, а при его периферическом введении — гипергликемия.

Гистамин при его инкубации со срезами коры головного мозга мышей в течение нескольких минут вызывает гидролиз примерно 70–80% всего внутриклеточного гликогена. H_1-агонисты, в отличие от H_2-агонистов, также обладали гликогенолитическим эффектом. Антагонисты адрено-, серотонино- и H_2-рецепторов не влияли на данный эффект гистамина, H_1-антагонисты по конкурентному механизму его подавляли.

При проведении сравнительного изучения способности H_1-агонистов вызывать гликогенолитический эффект в ткани мозга с их влиянием на связывание ^{3}H-мепирамина с H_1-нейрональными рецепторами было обнаружено, что гистамин значительно слабее ингибирует связывание ^{3}H-мепирамина ($K_и = 45$ мкМ), чем вызывает гликогенолиз ($EC_{50} = 3$ мкМ), что даёт возможность предполагать существование «избыточных гистаминовых рецепторов». Предварительная инкубация срезов коры головного мозга с гистамином приводила к уменьшению числа H_1-рецепторов, связывающих ^{3}H-мепирамин примерно на 20%, но не изменяла их сродства к этому радиолиганду. Предстоит выяснить, может ли такое небольшое изменение числа H_1-рецепторов обусловить столь сильный сдвиг кривой зависимости гликогенолитического эффекта гистамина от его концентрации, после предварительной инкубации срезов с гистамином [2].

^{3}H-гистамин обратимо, насыщаемым образом, с высоким сродством ($K_д = 7$ М) связывался с мембранами клеток головного мозга крыс. Различные нейромедиаторы заметно не влияли на это связывание гистамина. Изучение субклеточного распределения гистаминовых рецепторов показало, что их мало в синаптических везикулах, и они в основном локализованы в постсинаптических мембранах. Об этом также свидетельствует тот факт, что при нейрональной дегенерации, вызванной каиновой кислотой, число гистаминовых рецепторов уменьшалось на 50%, а после перерезки гистаминергичесих путей их число увеличивалось на 24%. В коре головного мозга число участков, связывающих ^{3}H-гистамин, равнялось 3,2 пмоль/г ткани; в полосатом теле оно было на 39% больше, а в таламусе, гипоталамусе, стволе мозга и мозжечке соответственно на 48, 48, 52, 89 и 97% меньше.

Поскольку способность H_1- и H_2-агонистов ингибировать связывание ^{3}H-гистамина с мембранами клеток головного мозга крыс не коррелирует с выраженностью их фармакологических эффектов, а H_1- и H_2-антагонисты лишь слабо ингибируют его связывание, можно полагать, что участки, связывающие ^{3}H-гистамин с высоким сродством, представляют собой новый класс гистаминовых рецепторов, отличных от H_1- и H_2-рецепторов, или являются H_2- и H_2-рецепторами, но с изменённой конформацией.

При изучении фармакологических свойств H_1-антагониста без седативной активности терфенадина [4-(1,1-диметилэтил)фенил]-4-(окси-дифенилметил)-1-перидинбутанола, обнаружено, что *in vitro* терфенадин имеет одинаковое сродство к H_1-рецепторам головного мозга и периферических тканей, а *in vivo* он слабее всех известных H_1-антагонистов ингибирует связывание ^{3}H-мепирамина с H_1-рецепторами коры головного мозга мышей. Эти данные соответствуют имеющимся сведениям о том, что терфенадин не обладаст седативным свойством.

Таким образом, можно резюмировать, что гистаминовым рецепторам ЦНС принадлежит важная роль в регуляции обмена углеводов, секреции гормонов, но на вопрос, как эти эффекты связаны с проявлением физиологических реакций, вызываемых гистаминергическими лигандами, мы ответить пока не можем.

5.3.2. Гистаминовые рецепторы сердца и сосудов. В большинстве работ, посвящённых изучению гистаминовых рецепторов сердца, использовали изолированные перфузируемые препараты сердца животных. Положительное хронотропное

действие гистамина и H_2-агонистов на сердце эффективно блокируется H_2-, но не H_1-антагонистами. Положительный инотропный эффект гистамина и его способность вызывать аритмию также блокировались как H_1-, так и H_2-антагонистами. В то же время гистамин реализует свой отрицательный дромотропный эффект, взаимодействуя с H_1-рецепторами. Данные исследований, посвящённых анализу роли типов гистаминовых рецепторов в опосредовании кардиотропных эффектов гистамина, позволяют заключить, что стимуляция H_1-рецепторов сопровождается снижением частоты сердечных сокращений, силы сокращений и атриовентрикулярной проводимости, стимуляция H_2-рецепторов — увеличением частоты, автоматизма и силы сердечных сокращений, а стимуляция как H_1-, так и H_2-рецепторов — вазодилатацией коронарных сосудов.

Гистамин повышает силу сердечных сокращений через различные гистаминовые рецепторы у человека и животных. Положительный инотропный эффект на человеческом сердце гистамин оказывал в тех же концентрациях, в которых повышал активность аденилатциклазы, т. е. через H_2-рецепторы. На изолированном сердце и на изолированных паппилярных мышцах морской свинки он вызывал усиление сокращений через H_2-рецепторы. Силу сокращений левого предсердия морской свинки гистамин повышал через H_1-рецепторы.

На изолированных сосочковых мышцах кролика положительный инотропный эффект (ПИЭ) гистамина связан с возбуждением H_1-рецепторов. На изолированном левом предсердии кролика повышение силы сердечных сокращений гистамином сопровождалось повышением уровня цАМФ и блокировалось циметидином, что характерно для возбуждения H_2-рецепторов. Какие же типы гистаминовых рецепторов опосредуют положительный инотропный эффект гистамина у морских свинок и кроликов? ПИЭ гистамина у свинок блокировался циметидином, а у кроликов — мепирамином. Следовательно, ПИЭ гистамина у свинок опосредуется H_2-, а у кроликов — H_1-рецепторами. Однако в случае блокады H_2-рецепторов у свинок гистамин усиливал силу сердечных сокращений через H_1-рецепторы, а у кроликов — через H_2-рецепторы в случае блокады H_1-рецепторов.

Таким образом, в ПИЭ гистамина вовлечены больше H_1-рецепторы у кроликов и H_2-рецепторы у свинок. Их активация подавляет вовлечение других рецепторов. Видовые различия обусловлены различиями не в плотности рецепторов, а в количестве аденилатциклазы.

У крыс и кошек ПИЭ гистамина связан с выделением катехоламинов. Гистамин вызывает высвобождение ^{3}H-норадреналина из правого предсердия кошки, предварительно преинкубированного с ^{3}H-норадреналином посредством экзоцитоза из окончаний сердечного симпатического нерва. На изолированном сердце собаки усиление сердечных сокращений, вызванное гистамином (0.1–100 мг), также подавлялось β-адреноблокаторами, но не антагонистами H_1- и H_2-рецепторов.

На изолированных эпикардиальных коронарных сосудах собак гистамин в низких концентрациях расширял, в больших вначале сужал, затем расширял коронарные сосуды. В аналогичных условиях агонист H_1- рецепторов 2-пиридилэтиламин в низких концентрациях только сужал, в больших вначале расширял, а затем сужал коронарные артерии. Агонист H_2-рецепторов димаприт только расширял сосуды. Эпикардиальные коронарные сосуды собак содержат H_1- и H_2-рецепторы, которые опосредуют коронаросуживающий и коронарорасширяющий, соответственно, эффекты гистамина [3]. Расширение коронарных сосудов большими концентрациями агонистов H_1-рецепторов, по-видимому, опосредовано выделением эндотелиального релаксирующего фактора. Сужение коронарных артерий большими концентрациями H_2-агонистов обусловлено их тираминоподобным действием и выделением норадреналина.

Коронарный кровоток в субэндокардиальной области миокарда собак усиливался при активации как H_2-, так и H_1-рецепторов. В эндокардиальных коронарных сосудах H_1-рецепторы опосредуют коронарорасширяющий эффект гистамина.

В изолированном сердце кролика гистамин сужал коронарные сосуды через H_1-рецепторы, так как антагонисты H_1-рецепторов мепирамин и хлорфенирамин устраняли действие гистамина. Таким образом, у животных гистамин через H_2-рецепторы расширяет, а через H_1-рецепторы сужает или расширяет коронарные сосуды.

У человека гистамин индуцирует спазм крупных коронарных артерий и релаксацию артерий малого калибра. Сосудосуживающее действие гистамина проявляется в ишемическом смещении сегмента ST на ЭКГ, увеличением скорости продукции миокардом молочной кислоты. Антагонисты H_1-рецепторов предупреждают коронароспазм. Расширение артерий малого калибра обусловлено активацией H_2-рецепторов.

H_2-рецепторы опосредуют сосудорасширяющее действие гистамина путём повышения внутриклеточного уровня цАМФ в гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов. Сокращение сосудов, опосредованное H_1-рецепторами, обусловлено повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+}. Концентрация Ca^{2+} в цитозоле под влиянием гистамина повышается двухфазно. Пиковый компонент этой реакции связан с высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а фаза плато — с поступлением Ca^{2+} извне, открытие Ca^{2+}-каналов связано с повышением уровня инозитолфосфата.

В норме роль гистаминовых рецепторов в регуляции деятельности сердца и сосудов недостаточно ясна. Блокада H_2-рецепторов фамотидином у здоровых испытуемых не изменяла АД, процент фракционного сокращения левого желудочка, круговое напряжение стенки в конце систолы, объёмный ударный индекс, сердечный индекс, общее сосудистое сопротивление. Предполагают, что у людей состояние основного левожелудочкового сокращения не зависит от H_2-медиаторных механизмов гистамина.

Роль H_3-рецепторов в норме также не известна. Стимуляция симпатических нервов лишь в 1,5 раза увеличивает выделение гистамина в сердце, но этого недостаточно для стимуляции H_3-рецепторов.

При ишемии выделение норадреналина возрастает и сопровождается увеличением выделения гистамина в 3,5 раза. В этих условиях H_3-рецепторы могут быть активированы эндогенным гистамином и играть важную роль в отрицательной регуляции выделения норадреналина.

Если в норме содержание гистамина в плазме крови у мужчин 7,0, а у женщин 8,1 мкг на 100 мл крови, то при инфаркте миокарда оно достигает у мужчин 12,2, а у женщин 12,7 мкг/100 мл. При наличии аритмий уровень гистамина повышается до 16,1 мкг/100 мл крови. Максимальный уровень содержания гистамина в крови наблюдается через 24 ч после начала болей.

В высвобождении гистамина из сердца при ишемии участвуют радикалы кислорода. Перфузия изолированного сердца морской свинки раствором, содержащим $FeCl_2$ и АДФ, заметно усиливала выделение гистамина, а добавление N-третбутил-α-фенилнитрона, связывающего свободные радикалы, уменьшало высвобождение гистамина.

Выделение гистамина сердцем повышается как в фазе ишемии, так и реперфузии. За повреждение миокарда при ишемии — реперфузии, по-видимому, ответственны H_1-рецепторы, так как антагонист H_1-рецепторов фенистил значительно уменьшал его. Освобождение гистамина из сердечной мышцы участвует в генезе ранней желудочковой аритмии во время острой ишемии миокарда.

На перфузируемом, по Лангендорфу, сердце гистамин, связываясь с H_2-рецепторами, индуцировал появление нового высокочастотного экстрасистолического фокуса. Циметидин блокировал эффекты гистамина. Гистамин (10^{-6} М) индуцировал

также спонтанную активность препаратов волокон Пуркинье. Действие гистамина усиливалось после обработки волокон барием и строфантином. Укорачивалось время появления спонтанного потенциала действия и при некоторых концентрациях гистамина увеличивалась амплитуда барий- и строфантин-индуцированных осцилляторных постпотенциалов, свидетельствующих о перегрузке клеток Ca^{2+}. Таким образом, гистамин вызывает аритмии через H_2-рецепторы под влиянием кальциевой перегрузки. Антагонист H_2-рецепторов циметидин у анестезированных крыс (120 мг внутривенно) увеличивал аритмогенную и летальную дозу аконитина, уменьшал частоту возникновения фибрилляции желудочков и гибель крыс, которым вводили $CaCl_2$, устранял аритмии, вызванные окклюзией коронарной артерий. У кроликов он задерживал возникновение и укорачивал длительность адреналиновой аритмии, у морских свинок увеличивал дозы строфантина G, вызывающие желудочковые экстрасистолы и гибель животных.

Не только H_2-, но и H_1-рецепторы участвуют в реализации аритмогенного действия гистамина. Аритмии, вызванные гистамином, на изолированном сердце морской свинки устранялись H_1- и H_2-антагонистами. Увеличение нормального синусового автоматизма и индукция патологического автоматизма устранялось H_2-антагонистами, а триггерные аритмии и замедление атриовентрикулярной проводимости — H_1- и H_2-антагонистами. Гистамин, 2-(2-тиазолин-этиламин)-агонист H_1-рецепторов, импромидин — агонист H_2-рецепторов снижали порог желудочковой фибрилляции сердца морской свинки. Влияние гистамина на порог желудочковой фибрилляции зависел, в основном, от действия на H_1-рецепторы, так как EC_{50} для тиазолин-этиламина составил 53,9 нМ, а для импромидина — 318 нМ. Фенкарол, блокатор H_1-рецепторов, обладал купирующим действием на моделях хлоркальциевой, адреналовой и строфантиновой аритмии.

Гипертрофия миокарда приводит к десенситизации β-адренорецепторов и сенситизации H_2-рецепторов. При застойной сердечной недостаточности количество β-адренорецепторов также понижается, а H_2-рецепторов сохраняется. Первый клинический агонист H_2-рецепторов импромидин был эффективен при застойной сердечной недостаточности, но обладал аритмогенным действием. Фенилпиридиналкилкванидины — арпромидин, ВИ-Е-50 и дифторированные аналоги ВИ-Е-75 и ВИ-Е-76 — сильные H_2-агонисты с дополнительным H_1-блокирующим действием за счёт подобной фенирамину части молекулы. Они обладают положительным инотропным и меньшим хронотропным и аритмогенным действиями, чем импромидин. В отношении увеличения dp/dt, минутного объёма, повышения АД соединения располагались таким образом: ВИ-Е-76 > ВИ-Е-75 > арпромидин > импромидин [3].

Положительный инотропный эффект арпромидина на изолированном сердце морской свинки в 100 раз выше, чем у гистамина. Соединения, дифторированные в положении 3,4-(ВИ-Е-75) или в положении 3,4-(ВИ-Е-76), или хлорирование в 3,4 положении (ВИ-Е-64) до 160 раз активнее гистамина. Новое производное триазола — амтемин вызывает положительный инотропный эффект, близкий по силе к гистамину.

При аутоиммунном миокардите у крыс и мышей гистамин оказывает положительное инотропное действие на сердце, опосредованное H_1-рецепторами, хотя в норме гистамин у крыс и мышей вызывает отрицательный инотропный эффект через H_2-рецепторы. В сердце нормальных мышей не определяются насыщаемые участки связывания, антагониста ^{3}H-мепирамина, а при аутоиммунном миокардите выявляется два участка связывания лиганда. По-видимому, в миокарде контрольных крыс присутствуют только H_2-рецепторы, а в аутоиммунном сердце — H_1 и H_2-рецепторы.

Таким образом, гистаминовые рецепторы сердца вовлечены в патогенез аритмий, миокардитов, инфаркта миокарда, гипертрофии сердца. С позиции рациональной фар-

макотерапии в схемы лечения заболеваний сердца необходимо включать гистаминергические средства. Однако недостаточная изученность биохимических и физиологических свойств гистаминовых рецепторов сердца, а также молекулярных механизмов их функционирования не позволяют это делать с достаточной эффективностью.

Дальнейшие исследования в этом направлении позволят широко использовать гистаминергические средства в качестве кардиотропных.

Гистамин и его H_1 и H_2-агонисты вызывают уменьшение артериального давления у большинства животных и человека. У кошек и собак H_1- и H_2-антагонисты ингибируют снижение артериального давления, вызываемое гистамином. В то же время у телят депрессивный эффект гистамина частично подавляется мепирамином и потенцируется буримамидом. Локальная аппликация гистамина обычно сопровождается вазодилатацией; это справедливо в отношении сосудов кожи, скелетных мышц, желудочно-кишечного тракта и др. Однако сосуды лёгких под воздействием гистамина либо расширяются, либо сужаются. Сосудосуживающий эффект гистамина подавляется H_1-антагонистами или переходит под их воздействием в сосудорасширяющий эффект, который, в свою очередь, блокируется H_2-антагонистами.

В капиллярах кожи людей выявлены H_1- и H_2-рецепторы. Вследствие этого H_1- или H_2-антагонисты, применяемые в отдельности, слабее подавляют развитие воспалительной реакции кожи, обусловленной гистамином, чем при их совместном введении. У цыплят H_1- и H_2-рецепторы опосредуют сосудорасширяющее действие гистамина. У кроликов, морских свинок и лошадей вазомоторный эффект гистамина имеет две фазы. Вначале наступает гипертензия, блокируемая H_1-антагонистами, затем развивается гипотензия, подавляемая H_2-антагонистами. Следовательно, у этих животных сосудосуживающее действие гистамина обусловлено H_1-рецепторами, а сосудорасширяющее — H_2-рецепторами.

5.3.3. Гистаминовые рецепторы бронхов. В характере действия гистамина на бронхи существуют значительные видовые различия.

Гистамин вызывает сокращение неисчерченных мышц бронхов у человека, морской свинки, кроликов, свиней, телят, лошадей, цыплят посредством взаимодействия с H_1-рецепторами. В то же время у кошек и овец гистамин расширяет бронхи, у первых связываясь с H_1-, а у вторых — с H_2-рецепторами.

У человека, лошади и морских свинок вызываемое H_2-антагонистами расслабление мышц бронхов блокируется H_2-антагонистами, но у других видов (кошки, крысы, кролики) релаксация бронхов, индуцируемая H_2-агонистами, не ингибируется H_2-антагонистами, что даёт возможность предполагать существование в дыхательных путях подтипов H_2-рецепторов.

5.3.4. Гистаминовые рецепторы неисчерченных мышц желудочно-кишечного тракта. Стимуляция гистамином сокращений желудка у крыс и подвздошной кишки у морских свинок опосредуется H_1-рецепторами. Увеличение гистамином физической фазы и уменьшение тонической фазы изометрического сокращения подвздошной кишки у морских свинок опосредованы H_1-рецепторами.

5.3.5. Гистаминовые рецепторы секреторных клеток желудочно-кишечного тракта. Введённый извне гистамин стимулирует функцию всех пищеварительных желез — слюнных, желудочных, поджелудочной и усиливает отделение желчи. Но наиболее сильно и специфично гистамин увеличивает продукцию HCl париетальными клетками желудка. H_2-Антагонисты ингибируют стимулируемую гистамином кислотную секрецию в изолированных желудках собак, кошек, крыс, мышей, морских свинок и лягушек. Эти данные подтверждают сделанное ещё J. H. Black (1972) предположение, что париетальные клетки желудка имеют H_2-рецепторы.

При изучении действия антагониста H_2-рецепторов ранитидина на ультраструктуру париетальных клеток собаки не было выявлено никаких токсических эффектов этого вещества и морфологических изменений при введении его даже в высоких дозах 225–450 мг/кг в сутки в течение года. В то же время введение ранитидина в дозе 30 мг/кг в сутки сопровождалось ингибированием секреции HCl париетальными клетками. Ещё одним подтверждением участия H_2-рецепторов в кислотной секреции желудка и, следовательно, в патогенезе гастродуоденальных заболеваний являются данные о том, что циметидин и ранитидин, но не H_1-антагонисты, дозозависимым образом ингибируют способность димаприта вызывать язву желудка у крыс.

Активация H_1-рецепторов желудка приводит к ингибированию секреции HCl. Антагонисты и агонисты H_1-рецепторов не влияют на кислотную секрецию изолированного препарата фундальной части желудка морской свинки, но вызывают сильную реакцию при воздействии агонистов или антагонистов H_2-рецепторов. По-видимому, действие на желудочную секрецию, опосредуемое через H_1-рецепторы, может быть воспроизведено только на целом желудке с сохранённым кровоснабжением. Изучая механизм, посредством которого H_1-рецепторы вовлечены в ингибирование кислотной секреции, K. T. Bunge и M. E. Parson (1978) пришли к выводу, что стимуляция H_1-рецепторов может приводить к высвобождению катехоламинов, которые ингибируют секрецию, взаимодействуя с β-адренорецепторами. H_2-антагонисты ингибируют секрецию слюны подчелюстной железой кошек. Буримамид не влиял на индукцию карбахолом секреции этой железы, что указывает на отсутствие высвобождения гистамина при холинергической стимуляции. При электрической стимуляции барабанной струны нейромедиатор, выделяемый из нехолинергических нервных окончаний, входящих в её состав, вызывает высвобождение гистамина из тканевых базофилов. Этот гистамин действует непосредственно на секреторные клетки, увеличивая секрецию на пресинаптические рецепторы, локализованные на холинергических нервных окончаниях, модулируя высвобождение ацетилхолина, и на мышцы сосудов, уменьшая кровоток.

5.3.6. Гистаминовые рецепторы мочевого пузыря. Влияния агонистов или антагонистов H_2-рецепторов на мочевой пузырь морских свинок не обнаружено, но он сокращался при стимуляции H_1-рецепторов.

H_1-агонист 2-аминоэтилтиазол, но не H_2-агонисты димаприт и импромидин, дозозависимым образом вызывает сокращения изолированных кусочков мочевого пузыря человека. Если H_1-антагонисты подавляли данный эффект H_1-агонистов, то H_2-антагонисты циметидин, метиамид и тиотидин потенцировали эффект гистамина в 3 раза. Как H_1-, так и H_2-антагонисты не влияли на исходную двигательную активность мочевого пузыря. Эти результаты позволяют считать, что H_1-рецепторы превалируют в мышцах мочевого пузыря человека, а H_2-рецепторы, присутствующие в небольшом числе, опосредуют релаксацию этих мышц. Отметим, что аналогичное соотношение между функцией и числом H_1- и H_2-рецепторов имеет место также в неисчерченных мышцах дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта.

5.3.7. Гистаминовые рецепторы желчного пузыря. Активация гистамином H_1-рецепторов сопровождается сокращением желчного пузыря, а при возбуждении H_2-рецепторов имеет место его расслабление.

5.3.8. Гистаминовые рецепторы матки. Мышечная оболочка матки содержит H_2-рецепторы, через которые реализуется способность гистамина ингибировать сокращения, стимулируемые электрическим током или ацетилхолином. При анализе влияния H_2-антагонистов на изолированную матку крыс было обнаружено, что циметидин и метиамид, но не ранитидин, кроме их прямого действия на H_2-рецепторы, обладают непрямым симпатомиметическим эффектом. Поскольку H_2-антагонисты, за

исключением ранитидина, высвобождают катехоламины из адренергических нервных окончаний матки — органа с высокой чувствительностью к норадреналину, данный непрямой эффект H_2-антагонистов необходимо учитывать при характеристике рецепторов, вовлечённых в ответ изолированной матки к гистамину.

5.3.9. Гистаминовые рецепторы эндокринной системы. Гистамин принимает участие в секреции пролактина, лютеинизирующего гормона, вазопрессина, тиреотропного гормона, соматотропного гормона, тироксина и других гормонов. H_1-агонисты и H_2-антагонисты усиливают секрецию гипофизарных гормонов — вазопрессина, АКТГ, пролактина, а H_1-антагонисты и H_2-агонисты ослабляют её. При изучении характер связывания H_2-антагониста циметидина, являющегося высвободителем пролактина у человека, с мембранами передней доли гипофиза крыс были определены параметры связывания циметидина с этими мембранами: $K_д$ составляла 40,3 нМ, а максимальное число связывающих участков — 1,94 пмоль/мг белка. Предполагается, что высвобождение пролактина под воздействием циметидина обусловлено непосредственным взаимодействием последнего с H_2-рецепторами передней доли гипофиза.

При стрессе H_1-агонист 2-пиридилэтиламин и H_2-агонисты 4-метилгистамин и димаприт увеличивают ответ системы гипофиз–надпочечники, оцениваемой по повышению концентрации кортикостерона в сыворотке крови у крыс. Данное повышение уровня кортикостерона в ответ на введение 2-пирилэтиламина блокировалось мепирамином или хлорпирамином, а в ответ на введение 4-метилгистамина и димаприта — метиамидом и циметидином. Следовательно, влияние гистамина на секрецию кортикостерона у крыс в состоянии стресса опосредовано как H_1-, так и H_2-рецепторами.

Внутривенное введение людям H_1-антагониста меклазина значительно ингибирует увеличение концентрации АКТГ и кортизола в крови, но не соматотропного гормона и пролактина, вызываемое гипогликемией. Меклазин после перорального введения также уменьшал секрецию АКТГ в ответ на уменьшение уровня кортизола при ингибировании его биосинтеза метирапоном. Эти результаты дают возможность предполагать, что гистамин, действуя на H_1-рецепторы, стимулирует высвобождение кортикотропин-рилизинг-фактора, который, в свою очередь, повышает секрецию АКТГ.

В мембранах фолликулярных клеток щитовидной железы имеются сопряжённые с аденилатциклазной системой H_2-рецепторы, опосредующие способность гистамина стимулировать секрецию тироксина.

Гистаминовые рецепторы вовлечены в регуляцию эндокринной функции поджелудочной железы. У собак высвобождение полипептида поджелудочной железы, вызываемое приёмом пищи, опосредовано как H_1-, так и H_2-рецепторами.

По нашему мнению, дальнейшее изучение роли гистаминовых рецепторов в регуляции функции эндокринной системы поможет найти новые пути их коррекции.

5.3.10. Гистаминовые рецепторы и иммунные реакции. Как известно, лейкоциты и тканевые базофилы, наряду с рецепторами для инсулина, катехоламинов и простагландинов, содержат гистаминовые рецепторы.

В экспериментах на культурах тканевых базофилов и лейкоцитов обнаружено, что добавление гистамина в окружающую среду приводит к повышению содержания в них цАМФ и к уменьшению высвобождения их них гистамина в процессе иммунной реакции с антигеном. Добавление в среду H_2-антагонистов в отличие от H_1-антагонистов блокировало данное действие гистамина на высвобождение его в ответ на развитие иммунной реакции. Таким образом, гистамин, взаимодействуя с H_2-рецепторами тканевых базофилов по механизму обратной связи может тормозить

дальнейшую дегрануляцию клеток, его депонирующих. На основании этих результатов была сформулирована гипотеза о двойственной роли гистамина в иммуновоспалительных реакциях: с одной стороны, гистамин, увеличивая проницаемость капилляров, усиливает воспаление, но, с другой, при повышении его содержания в среде он через H_2-рецепторы тканевых базофилов и лейкоцитов повышает содержание цАМФ в них и тем самым ингибирует процесс своего высвобождения.

Гистамин также влияет на H_2-рецепторы лимфоцитов. Обнаружено, что гистамин ингибирует цитолитическое действие Т-лимфоцитов мышей. Данный эффект гистамина был опосредован цАМФ и полностью блокировался H_2-антагонистами буримамидом и метиамидом.

Связываясь с H_2-рецепторами, гистамин ингибировал хемотаксис эозинофилов и базофилов.

Следовательно, гистамин, который высвобождается во время развития анафилактических реакций, может влиять на выраженность последующих реакций иммунного ответа организма, взаимодействуя с H_2-рецепторами клеток, принимающих участие в этом ответе.

Таким образом, представленные результаты фармакологического анализа гетерогенности и функции гистаминовых рецепторов подчёркивают их широкое распространение в различных органах и тканях млекопитающих.

Каждый год публикуются новые данные об открытии гистаминовых рецепторов ранее не известной локализации. Ещё нет уверенности, что в настоящее время мы имеем полное представление о распределении гистаминовых рецепторов в организме и их функции.

Следует отметить, что роль гистаминовых рецепторов в регуляции функции того или иного органа не одинакова. В соответствии с эффективностью H_1- и H_2-антагонистов можно считать, что H_1-рецепторы в основном локализованы в бронхах, подвздошной кишке и ЦНС, а H_2-рецепторы — в слизистой оболочке желудка.

5.4. Молекулярные механизмы взаимодействия гистамина и его аналогов с гистаминовыми рецепторами

В физиологических условиях молекула гистамина вследствие резонанса может существовать в трёх формах (I, II, III).

Согласно биохимической номенклатуре, атом азота имидазольного кольца гистамина, прилежащий к боковой цепи, обозначается как *pros*-атом азота (N^{π}), или пиридиновый, а противолежащий — как *tel*-атом азота (N^{τ}), или пиррольный.

Предполагается, что только в первой форме гистамин способен связываться с рецепторами. Поскольку различные заместители при атомах азота имидазольного кольца приводят к потере у производных гистамина активности по отношению к рецепторам, можно считать, что водородные связи участвуют в комплексировании гистамина с его рецепторами. Применение квантово-механических методов расчёта для изучения электронной структуры гистамина позволило установить, что все атомы азота гистамина способны образовывать водородные связи (внутри- и межмолекулярные).

Считается, что для реализации действия молекулы гистамина на H_1-рецептор достаточно образования одной водородной связи с прилежащим атомом азота гетероцикла. Активность аналогов гистамина в отношении H_2-рецепторов может обеспечиваться лишь при наличии в гетероцикле одновременно двух атомов азота, которые фиксируются двумя водородными связями. Это необходимо для переноса протона из одного активного центра (А) H_2-рецептора в другой (В).

Конформационный анализ, показал, что боковая цепь молекулы гистамина может находиться в двух стабильных конформациях: гош- и транс-форме. Хотя гош-форма является энергетически более выгодной, при гидратации в водных растворах разность энергий двух конформеров нивелируется и обе формы присутствуют примерно в равных соотношениях.

Предполагается, что цис-таутомер ($\theta_1 = 120°$, $\theta_2 = 300°$) комплементарен H_2-рецепторам, а транс-таутомер ($\theta_1 = 0°$, $\theta_2 = 180°$) — H_1-рецепторам.

Анализ зависимости действия аналогов гистамина от структуры различных заместителей в циклической части молекул позволил предложить схему строения рецепторов гистамина. Как H_1-, так и H_2-рецепторы гистамина имеют центр, образующий водородную связь с аммонийной группой этиламинной цепи. Вещества с липофильным заместителем в положении 2 имидазольного кольца — агонисты H_1-, но не H_2-рецепторов, а вещества с гидрофильным заместителем в этом положении — агонисты H_2-, но не H_1-рецепторов. В отличие от H_2-рецепторов H_1-рецепторы содержат липофильный диполь, который принимает участие в образовании дополнительной связи с атомом С-5 гетероцикла. В отношении H_1-рецепторов известно, что Na^+, гуаниновые нуклеотиды, такие как ГТФ, ГДФ и ГМФ-ФНФ, уменьшают способность гистамина, но не его антагонистов вытеснять ^{3}H-мепирамин из его связи с H_1-рецепторами. В то же время Mg^{2+} и Mn^{2+} увеличивают сродство гистамина к H_1-рецепторам.

При использовании в качестве H_1-рецепторной системы препарата продольного слоя мышечной оболочки подвздошной кишки морской свинки обнаружено, что при уменьшении температуры с 37 до 15 °С активность классических антагонистов H_1-рецепторов хлорфенирамина и трипеленамина снижается, но появляется способность у H_2-антагониста метиамида блокировать действие гистамина, выражающееся в сокращении отрезка подвздошной кишки морской свинки. При 37 °С 2-галоидалкиламины, являющиеся необратимыми антагонистами H_1-рецепторов, сдвигали кривую зависимости доза–эффект для гистамина и снижали максимальный ответ кишки на действие гистамина, а при 15 °С они не вызывали сдвига этой кривой, но блокировали действие гистамина по неконкурентному типу. Согласно полученным результатам, снижение температуры приводит к заметным изменениям свойств рецепторов гистамина, что оказывает сильное влияние на эффекты конкурентных и необратимых антагонистов гистамина, но не на активность самого гистамина. Авторы предполагают, что данная рецепторная система содержит по крайней мере один тип связывающих участков, который ответствен за действие антагонистов, но не самого гистамина и что температурные изменения могут каким-то образом влиять на избирательность некоторых участков рецептора. По-видимому, изменения свойств рецепторов отражают изменения структуры мембраны, происходящие при изменении температуры, как это имеет место в случае мембраносвязанных ферментов.

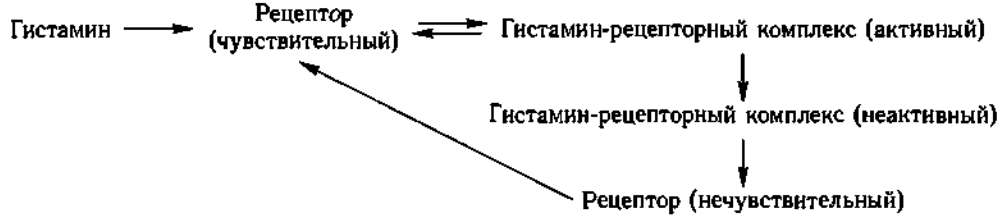
По аналогии с адрено- и холинорецепторами гистаминовые рецепторы становятся менее чувствительными к антагонистам при их длительном возбуждении (феномен десенситизации).

Предварительная инкубация клеток нейробластомы мышц с гистамином снижает образование цГМФ при стимуляции H_1-рецепторов. Данная десенситизация H_1-рецепторов была специфична, обратима, сопряжена с уменьшением величины максимального образования цГМФ и вызывалась только агонистами. Скорость развития десенситизации зависела от концентрации гистамина, а вот восстановление первоначальных свойств этих H_1-рецепторов не зависело от концентрации агониста.

При снижении чувствительности гистаминовых рецепторов подвздошной кишки морской свинки к агонистам наблюдается уменьшение способности антагониста феноксибензамина подавлять взаимодействие гистамина с данными рецепторами. Этот

факт свидетельствует об изменениях на рецепторном уровне, возможно, о конформационных перестройках рецепторов на фоне уменьшения чувствительности H_1-рецепторов к гистамину.

Этапы десенситизации и восстановления чувствительности гистаминовых рецепторов можно представить следующим образом:



Число гистаминовых рецепторов и их связывающие свойства могут изменяться при тех или иных воздействиях (введение крысам H_1-антагониста дифенгидрамина значительно повышает число участков, специфически связывающих ^{3}H-мепирамин), что также необходимо учитывать при исследовании молекулярной природы их комплексообразования с лигандами.

В будущем применение новых физико-химических методов должно дополнить пока ещё ограниченные знания о молекулярных механизмах взаимодействия гистамина и его аналогов с гистаминовыми рецепторами.

Для изучения биохимических эффектов, обусловленных активацией H_1-рецепторов, оказалось полезным использовать культуры нейрональных клеток. В ответ на воздействие гистамина в клетках нейробластомы мыши (клон NIE-115) происходит быстрое и транзиторное увеличение уровня цГМФ. Данная стимуляция образования цГМФ ингибировалась H_1-антагонистами, но не H_2-антагонистами, что указывает на вовлечение H_1-рецепторов в действие гистамина на образование цГМФ. Эффекты, связанные с активацией H_1-рецепторов, являются Ca^{2+}-зависимыми.

Индукция гистамином образования цГМФ в верхнем шейном ганглии быка также опосредована H_1-рецепторами. Возможно, данное увеличение уровня цГМФ связано с постганглионарным возбуждением.

Ещё одним биохимическим изменением в клетках после активации H_1-рецепторов является гидролиз гликогена в ЦНС. H_1-рецепторы определяются по специфическому связыванию селективных антагонистов мепирамина и трипролидина. В левом предсердии кролика [^{3}H]-мепирамин связывался гистаминовыми рецепторами с $K_д = 3{,}8$ нМ и $B_{max} = 96$ фМ/мг белка, в мембранной фракции желудочков и правого предсердия морской свинки — с $K_д = 4{,}35$ нМ и 414,9 нМ соответственно, а левого предсердия — с $K_д = 1{,}5 \pm 0{,}2$ нМ, $B_{max} = 307 \pm 2{,}7$ фМ/мг белка. Двухвалентные катионы (Ca, Mg, Mn, Si, Ba) обладали способностью увеличивать связывание [^{3}H]-мепирамина с H_1-рецепторами.

Эффекторной системой, сопряжённой с H_1-рецепторами, является фосфолипаза С. Возбуждение H_1-рецепторов через G_i/G_o-белки приводило к активации фосфолипазы С и распаду фосфатидилинозитола. Образовавшийся инозитолфосфат вызывал выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо и увеличивал поступление Ca^{2+} в клетку извне. Гистамин стимулировал накопление инозитол-1-фосфата после начального скрытого периода. Уровень последнего повышался в 2 раза через 60 мин после введения гистамина. Активация H_1-рецепторов приводит к стимуляции синтетазы окиси азота (через кальций/кальмодулин-зависимый путь) и последующей активации растворимой гуанилатциклазы в различных типах клеток. Кроме того, эти рецепторы также опосредуют действие гистамина, приводящее к высвобождению арахидоно-

вой кислоты и синтезу её метаболитов — простациклина и тромбоксана A_2. Хотя H_1-рецепторы не сопряжены с аденилатциклазой, они принимают участие в регуляции уровня цАМФ путём усиления активации этого фермента при стимуляции H_2-рецепторов, аденозиновых A_2-рецепторов и рецепторов вазоактивного кишечного полипептида.

Все H_1-рецепторы состоят из 491 аминокислотного остатка, но H_1-рецепторы сердца, по-видимому, отличаются от таковых мозга. В сердце домен H_1-рецептора, связывающий лиганды, имеет молекулярную массу 68 кДа, в мозге — в пределах 56–59 кДа.

Таким образом, в отношении H_1-рецепторов можно постулировать, что они сопряжены посредством G-белков с системами регуляции уровня цГМФ и Ca^{2+}, а также обмена фосфолипидов и гликогена.

H_2-рецепторы сопряжены с аденилатциклазой, и их стимуляция сопровождается накоплением цАМФ в клетках. Это справедливо в отношении H_2-рецепторов париетальных клеток слизистой оболочки желудка, сердца, матки (хотя в матке не обнаружена гистаминчувствительная аденилатциклаза, гистамин повышает внутриклеточную концентрацию цАМФ, а буримамид блокирует этот эффект), головного мозга, жировых клеток, мышц сосудов, лейкоцитов и лимфоцитов.

H_2-рецепторы определяются по специфическому связыванию селективных антагонистов ранитидина и тиотидина. [^{3}H]-тиотидин связывался с мембранами левого предсердия морской свинки с $K_д = 10{,}8 \pm 1{,}2$ нМ и $B_{max} = 41 \pm 8$ фМ/мг. В левом предсердии кролика места связывания [^{3}H]-тиотидина характеризовались $K_д = 14{,}7$ нМ, $B_{max} = 126$ фМ/мг белка. Ещё один антагонист H_2-рецепторов [^{3}H]-циметидин связывался с мембранами мозга с $K_д = 15{,}7$ нМ, $B_{max} = 276$ фМ/мг белка.

H_2-рецепторы состоят из 359 аминокислотных остатков, имеют 7 трансмембранных доменов и сопряжены с G-белками.

В человеческом сердце, полученном при трансплантации у реципиентов, гистамин, зависимо от содержания Mg и ГТФ, повышал активность аденилатциклазы. Его действие подавлялось циметидином. Активность аденилатциклазы, стимулированной гистамином, подавлял и тиотидин. Из этого следует, что H_2-рецепторы при помощи G-белков сопряжены с аденилатциклазой.

Гистамин может также повышать активность аденилатциклазы путём метилирования фосфолипидов. В присутствии донора метильных групп (S)-аденозил-α-метионина гистамин стимулировал активность аденилатциклазы. Этот эффект подавлялся ингибитором фосфолипидных метилтрансфераз 8-аденозин-α-гомоцистеином, а также антагонистом H_2-рецепторов циметидином. По мнению авторов, метилирование фосфолипидов гистамином усиливает сопряжение H_2-рецепторов с аденилатциклазой. В правом предсердии морской свинки метилирование фосфолипидов может активировать аденилатциклазу так же эффективно, как и ГТФ-связывающие белки.

Было замечено, что гистамин активирует медленные Na^+–Ca^{2+} каналы возбудимой мембраны миокарда, вызывая ускорение потенциала действия за счёт ускорения реполяризации изолированных полосок желудка сердца морской свинки. Это объяснялось увеличением поступления Ca^{2+} в клетку с последующим усилением выхода K^+ из клетки в фазе реполяризации. Действительно, на изолированных перфузируемых миоцитах желудочков морской свинки гистамин увеличивал амплитуду Ca^{2+}-тока (ICa), а также выходящего K^+-тока. Действие гистамина было опосредовано цАМФ и зависело от активации аденилатциклазы. Оно устранялось циметидином. Следовательно, увеличение тока K^+ и Ca^{2+}, вызываемого гистамином, опосредовано H_2-рецепторами, связанными с G_s-белками и аденилатциклазой.

Путём активации Ca^{2+}-каналов гистамин индуцирует потенциал действия. На фрагментах ткани синоатриального и атриовентрикулярного узлов сердца морской свинки и кролика гистамин увеличивал частоту пейсмекерных потенциалов действия и уменьшал длительность потенциала действия, диастолический потенциал синоатриального узла обоих видов и атриовентрикулярного узла у свинок, вызывал в 40% случаев аритмии. Эффект гистамина блокировался циметидином. Таким образом, положительный хронотропный и аритмогенный эффекты гистамина опосредуются H_2-рецепторами.

H_2-рецепторы тесно взаимодействуют с адренорецепторами. Электрофизиологические следствия стимуляции H_2- и β-адренорецепторов схожи. На изолированном правом предсердии морской свинки гистамин и норадреналин вызывали увеличение ЧСС путём активации разных типов рецепторов. При совместном действии гистамин через H_2-рецепторы ослаблял эффекты норадреналина, сдвигая вправо кривую доза–эффект норадреналина. Присутствие гистамина уменьшало сродство β-адренорецепторов к лигандам. Присутствие норадреналина, в свою очередь, ослабляло действие гистамина на сердце, сдвигая кривую доза–эффект последнего вправо. Истощение запасов норадреналина предварительным введением резерпина, напротив, приводило к повышению чувствительности изолированного сердца морской свинки и папиллярных мышц крысы к гистамину. За гиперчувствительность были ответственны H_2-рецепторы. Таким образом, в сердце имеет место кооперативное взаимодействие α_2-адренергических и H_2-гистаминовых рецепторов.

Длительное воздействие антагонистов приводит к повышению сродства H_2-рецепторов к лигандам без изменения плотности рецепторов.

Гистамин и ГТФ в отношении их влияния на активность аденилатциклазы желудочков сердца морских свинок являются синергистами. Гистамин и гуанилимидодифосфат оказывают синергическое действие на аденилатциклазу париетальных клеток желудка крыс.

Увеличение уровня цАМФ, следуемое за стимуляцией H_2-рецепторов, приводит к запуску цепи биохимических реакций, реализующих специфическую физиологическую реакцию того или иного типа клеток.

Связывание ^{3}H-гистамина с H_2-рецепторами мембран слизистой оболочки желудка морских свинок хорошо коррелирует со способностью гистамина увеличивать содержание цАМФ в клетках слизистой оболочки желудка и стимулировать секрецию HCl обкладочными клетками.

Гистамин, взаимодействуя с H_2-рецепторами париетальных клеток желудка крысы, стимулирует аденилатциклазу. Синергистом этого эффекта гистамина был гуанилимидодифосфат. Важно отметить, что состояние, в которое переводили гистамин и гуанилимидодифосфатаденилатциклазу (активность фермента превышала первоначальную в 15 раз) после предварительной инкубации с ними клеток, не обращалось циметидином или ГТФ. Считается, что повышение уровня цАМФ в париетальных клетках желудка активирует карбоангидразу, которая катализирует образование свободных Cl^- и H^+ и тем самым стимулирует продукцию HCl. Для других клеток, воспринимающих молекулярные сигналы от гистамина посредством H_2-рецепторов, даже гипотетических схем трансформации этого сигнала в физиологическую реакцию пока нет.

Гистаминовые H_3-рецепторы находятся на постганглионарных симпатических нервных окончаниях, иннервирующих сердце и сосуды. Их активация угнетает выделение норадреналина; селективными лигандами H_3-рецепторов являются (R)-α-метилгистамин (агонист) и тиоперамид (антагонист). ^{3}H-метилгистамин связывался с мембранами мозга морской свинки с $K_д = 0{,}4$ нМ, $B_{max} = 41$ фМ/мг белка. H_3-рецепторы тесно взаимосвязаны с α_2-адренорецепторами. На срезах стриатума было

показано, что активация α_2-адренорецепторов уменьшает H_3-рецепторное ингибирование высвобождения норадреналина и адреналина и наоборот.

Активация периферических H_3-рецепторов и торможение выделения норадреналина блокируют адренергический инотропный ответ в предсердии морских свинок. Так, агонист H_3-рецепторов (R)-α-метилгистамин (10^{-10}–10^{-5} М) вызывал ингибирование сократительного ответа изолированного ушка предсердия морской свинки на электрическую стимуляцию симпатического нерва, но не изменял сокращения, вызванного экзогенным норадреналином. Отрицательный инотропный и хронотропный эффекты (R)-α-метилгистамина на изолированном предсердии морской свинки ослаблялись коклюшным токсином и усиливались блокатором Ca^{2+}-каналов N-типа ω-конотоксином. Таким образом, H_3-рецепторы, локализованные в окончаниях сердечного симпатического нерва и модулирующие высвобождение норадреналина, сопряжены с G_i/G_o-белками и снижают проводимость Ca^{2+}-каналов. Эксперименты на препаратах тканей головного мозга также показали сопряжённость H_3-рецепторов с G-белками.

H_3-рецепторы имеют видовые отличия. Так, агонист H_3-рецепторов (R)-α-метилгистамин у свинок снижал АД и уменьшал ЧСС, у кроликов — снижал АД, но повышал ЧСС, на крыс — не влиял.

Таким образом, хотя мы не располагаем достаточным количеством данных о механизмах функционирования H_3-рецепторов, есть все основания считать, что они относятся к семейству рецепторов, сопряжённых с G-белками.

5.5. Гистаминовые рецепторы — мишень действия лекарственных веществ

Исследования нейрохимических и патофизиологических механизмов функционирования гистаминовых рецепторов позволили приблизиться к пониманию молекулярных механизмов действия широко применяемых в клинической практике антигистаминных средств. В обобщённом виде сродство различных антигистаминовых веществ к гистаминовым рецепторам представлено в табл. 5.1.

В данном разделе мы рассмотрим некоторые аспекты молекулярных основ использования этих средств для лечения различных заболеваний.

Несмотря на многообразие фармакологического действия гистамина весь спектр его активности можно свести к следующим аспектам: гистамин является медиатором аллергических реакций, наряду с другими медиаторными веществами и гормонами, регулирует практически повсеместно тонус гладких мышц, действует как стимулятор секреции на париентальные клетки желудка, выполняет роль синаптического медиатора в нервной системе. Установлено, что гистамин и его агонисты вызывают падение артериального давления у большинства животных и человека.

При внутрикожном введении гистамина развиваются явления, которое в литературе получили название триады Леви. Вслед за введением гистамина в месте инъекции возникает резко очерченная краснота, вызванная расширением капилляров. Вокруг неё через несколько секунд появляется диффузная краснота в виде пятна из-за расширения артериол вследствие аксон-рефлекса. Наконец, заключительной стадией этой тройной реакции является возникновение через 2 мин вблизи места введения гистамина папулы, вызванное повышением проницаемости капилляров и отёком тканей. Установлено, что гистамин обладает положительным хронотропным и инотропным и отрицательным дромотропным эффектом, увеличивает коронарной кровоток непосредственно и опосредовано (высвобождение катехоламинов, расширение периферических сосудов, изменение лёгочного кровообращения.)

Таблица 5.1

Свойства различных гистаминовых рецепторов и сродство к ним гистаминергических веществ [87]

Свойство рецептора	Рецептор			
	H_1	H_2	H_3	H_4
Наиболее изученная функция	Острые аллергические реакции	Секреция кислоты в желудке	Модуляция нейромедиаторов	Иммуномодуляция
Сопряжение с G-белком	$G\alpha_q$	$G\alpha_s$	$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{i/o}$
Основной вторичный медиатор	Увеличение уровня Ca^{2+}	Увеличение уровня цАМР	Ингибирование образования цАМР	Увеличение уровня Ca^{2+}
Гистамин pK_i	4,2	4,3	7,8	8,1
Дифенгибрамин pK_i	7,9	$>10{,}000$*	<5	<5
Лоратадин pK_i	6,8	н. о.	н. о.	<5
Цетиризин pK_i	8,0	н. о.	н. о.	<5
Фексофенадин pK_i	8,3	н. о.	н. о.	<5
Ранитидин pK_i	<4	7,1	<5	<5
Циметидин pK_i	<5	6,2	<5*	<5
Тиоперадин pK_i	<5	<4	7,3	7,2
JNJ 7777120 pK_i	<5	$>4{,}5$	5,3	8,4

* pK_i — отрицательный логарифм кажущейся константы диссоциации; н. о. — не определено.

Помимо действия на гладкую мускулатуру стенок сосудов, гистамин вызывает повышение тонуса и усиление автоматических движений органов с гладкой мускулатурой (бронхи, пищевод, желудок, кишечник, матка, желчный пузырь, селезёнка, мочеточники, мочевой пузырь) у большинства животных. Повышение тонуса гладкой мускулатуры при введении больших доз гистамина может происходить вплоть до её спазма.

Как лекарственное средство гистамин имеет ограниченное применение. Для медицинского применения препарат получают путём бактериального расщепления гистидина или синтетическим путём. Выпускается в виде дигидрохлорида (*Histamini dihydrochloridum*). Белый кристаллический порошок гигроскопичен, легко растворим в воде, трудно в спирте; pH водных растворов 4,0–5,0. Пользуются гистамином иногда при полиартритах, суставном и мышечном ревматизме: внутрикожное введение дигидрохлорида гистамина (0,1–0,5 мл 1 %-го раствора), втирание мази, содержащей гистамин, и электрофорез гистамина вызывают сильную гиперемию и уменьшение болезненности; при болях, связанных с поражением нервов; при радикулитах, плекситах и т. п. препарат вводят внутрикожно (0,2–0,3 мл 0,1 %-го раствора). При аллергических заболеваниях, мигрени, бронхиальной астме, крапивнице иногда проводят курс лечения малыми, возрастающими дозами гистамина. Предполагают, что организм при этом приобретает устойчивость к гистамину и этим уменьшается предрасположение к аллергическим реакциям. Применение в качестве десенсибилизирующего средства при аллергических заболеваниях имеет также содержащий гистамин

препарат гистаглобулин. Начинают с внутрикожного введении очень малых доз гистамина (0,1 мл в концентрации 1/10, для чего содержимое ампулы, т. е. 0,1%-й раствор, разводят соответствующим количеством изотонического раствора натрия хлорида), затем дозу постепенно увеличивают. Гистамином пользуются также для фармакологической диагностики феохромоцитомы и феохромобластомы; проводят комбинированную пробу с тропафеном. В связи со стимулирующим влиянием гистамина на желудочную секрецию его иногда применяют для диагностики функционального состояния желудка. При этом необходимо соблюдать большую осторожность из-за возможных побочных явлений (гипотензивное действие, бронхиолоспазм и др.). В настоящее время для этой цели пользуются другими препаратами (пентагастрин, бетазол и др.). При передозировке и повышенной чувствительности к гистамину могут развиться коллапс и шок. При приёме внутрь гистамин трудно всасывается и эффекта не оказывает. Гистамином широко пользуются фармакологи и физиологи для экспериментальных исследований. Формы выпуска гистамина дигидрохлорида: порошок; 0,1% раствор в ампулах по 1 мл (*Solutio Histamini dihydrochloridi* 0,1% *pro injectionibus*) в упаковке по 10 ампул. Хранение: список Б. В защищённом от света месте.

5.6. Антагонисты H_1-рецепторов

В 1937 г. Даниэль Бове (D. Bovet) синтезировал первое вещество — 2-изопропил-5-метил-феноксиэтилдиэтиламин (дифенгидрамин), обладающее конкурентном антагонизмом к гистамину. За последующие десятилетия было синтезировано большое количество соединений, эффективно блокирующих H_1-рецептор. К препаратам первого поколения, обладающим выраженным седативным эффектом относятся дифенгидрамн (димедрол), прометазин (пипольфен), хлорпромазин (супрастин), клемастин (тавегил), мебгидролин (диацин). Препарат диазолин седативного действия не оказывает, однако вызывает раздражение слизистой желудка. Для предотвращения последнего разработана комбинация диазолина с сульфатом цинка (препарат Диацин). При этом цинк позволяет не только предупредить раздражающее действие диазолина на слизистую желудка, но и увеличить его антиаллергические эффекты. С рецептором большинство указанных соединения взаимодействуют, конкурируя с гистамином, в результате их эффект является относительно кратковременным и требуется приём 3–4 раза в сутки (кроме клемастина, наиболее активного в данной группе — доза 1–2 мг/сут). Блокирование H_1-рецепторов противогистаминными лекарственными средствами первого поколения ведёт к запаздыванию психомоторных реакций (это важно для водителей), вызывает сонливость, димедрол используется в качестве седативного и снотворного средства. Во время приёма противогистаминных лекарственных средств первого поколения не должно осуществляться управление транспортными средствами.

Второе поколение антигистаминных средств не проявляет побочного седативного действия, так как плохо проникает через ГЭБ. Связывание с рецептором происходит по неконкурентному механизму, благодаря чему их действие является более продолжительным, чем у препаратов первого поколения. H_1-антагонисты последнего поколения могут быть подразделены, в свою очередь, на две подгруппы. Одну из них составляют препараты, которые являются соединениями, подвергаемыми в организме метаболизму, в результате чего образуются активные метаболиты, оказывающие противогистаминное действие, — лоратадин (кларитин), эбастин (Кестин). Ко второй подгруппе относятся препараты, которые либо незначительно метаболизируются, — акривастин (семпрекс), либо являются активным метаболитом с антигистаминными свойствами, — цетиризин (зиртек) фексофенадин (фексадин). Одним из последних

препаратов этого ряда является дезлоратадин (эриус) на основе метаболита лоратадина. По блокирующей активности в отношении H_1-рецепторов дезлоратадин в 2,5–4 раза превосходит антигистаминные препараты 2-го поколения (суточная доза 5 мг). Он тормозит секрецию тучными клетками и базофилами гистамина, триптазы, $ПГ_{D2}$, $ЛТ_{C4}$. Проявляет противовоспалительную активность за счёт подавления секреции эффекторными клетками провоспалительных цитокинов, хемокинов, межклеточных адгезивных молекул, торможения хемотаксиса и процесса активации эозинофилов. Метаболизируется в печени путём глюкуронирования. Действие препарата начинает проявляться через 10 мин после приёма и достигает максимума через 1–1,5 ч. Период полувыведения колеблется от 21 до 24 ч, что обеспечивает достижение терапевтического эффекта при назначении препарата 1 раз в сутки. Приём пищи не оказывает существенного влияния на фармакокинетику и доступность препарата. Дезлоратадин применяется для устранения симптомов аллергического ринита и хронической крапивницы. Под руководством академика РАМН М. Д. Машковского создан оригинальней блокатор H_1-рецепторов хифенадин (Фенкарол). Этот препарат не проникает через гематоэицефалический барьер и поэтому не оказывает побочного действия на ЦНС. Для снижения частоты и силы аллергических реакций также используются блокаторы высвобождения гистамина кромоглициновая кислота (интал) и кетотифен (задитен).

Аллергия и анафилаксия. Хорошо известно, что H_1-антагонисты достаточно успешно применяются в клинике для лечения ринитов, дерматитов и анафилактоидных реакций. Следует отметить, что, во-первых, они не во всех случаях эффективны, во-вторых, некоторые препараты теряют активность при длительном использовании, в-третьих, у многих больных они вызывают побочные эффекты. В последнее время появились сведения, что для терапии этих заболеваний более эффективно использование комбинации H_1- и H_2-антагонистов.

Бронхиальная астма. В вопросе использования антагонистов гистамина для лечения бронхиальной астмы ещё много неясного. Гистамин является мощным стимулятором сокращения мышц бронхов за счёт активизации главным образом H_1-рецепторов. Можно было бы предположить, что H_1-антагонисты будут купировать приступы бронхиальной астмы. Однако оказалось, что эти вещества очень слабо помогают при спазме бронхов. Поскольку ингибитор высвобождения гистамина кромогликат динатрия с большим успехом применяется для профилактики бронхиальной астмы. Можно думать, что неэффективность H_1-антагонистов обусловлена слишком высокой локальной концентрацией гистамина в лёгких. При этом H_1-антагонисты могут блокировать активность гистамина только в очень высокой (непереносимой) концентрации. В связи с этим большие усилия предпринимаются для синтеза новых, более эффективных антигистаминных препаратов, в частности, производных бензоциклогапетиофена.

Психические заболевания. Хорошо известно, что многие H_1-антагонисты оказывают центральное успокаивающее и снотворное действие.

Фундаментальные исследования по выявлению связи между способностью различных ЛВ вытеснять H_1-антагонист ^{3}H-мепирамин из его связи с H_1-рецепторами головного мозга мышей *in vivo* и их седативными эффектами у людей провели J. Schwartz и др. (1980). Ими выявлена корреляция между связыванием психотропных веществ с H_1-рецепторами и их седативной активностью.

Антигистаминные препараты широко используют в качестве противорвотных средств. Считается, что в данном случае терапевтический эффект обусловлен блокированием H_1-рецепторов области *postrema*.

В последнее время анализируются возможности использования антигистаминных средств для лечения приступов мигрени. Согласно полученным результатам, H_1-ан-

тагонисты неэффективны, а комбинация H_1- и H_2-антагонистов даёт положительные результаты при транзиторной, но не при хронической головной боли. Важной проблемой в терапевтическом использовании антигистаминных средств остаётся выяснение механизмов развития толерантности к их седативным эффектам.

Таким образом, приведённые факты дают возможность заключить, что при различных заболеваниях раздельное воздействие H_1- или H_2-антагонистами часто менее эффективно, чем комбинированное. В то же время мы считаем, что прогресс в лечении многих болезней, в патогенезе которых важная роль принадлежит гистамину, будет определяться синтезом гистаминергических средств с селективным действием только на определённые гистаминовые рецепторы в ЦНС и других органах и тканях.

Блокаторы H_1-рецепторов назначают для лечения различных аллергических заболеваний: крапивницы, ангеоневротического отёка, зудящих дерматитов, конъюктивита, при некоторых нервных заболеваниях (болезни Меньера, энцефалите, бессонице), нарушений функции кишечника, сенной лихорадке, сывороточной болезни, а также аллергических заболеваниях, связанных с применением лекарственных препаратов.

5.7. Антагонисты H_2-рецепторов

История этих соединений начинается с 1972 г., когда Black и др. сообщили об антигистаминовом действии N-метил-N-4-(4,5)-имидазолилбутилтиомочевины (буримамида). Позже был синтезирован ещё ряд соединений этого ряда, из которых применяется циметидин.

В отличие от H_1-, H_2-антагонисты гидрофильны. Их сходство с гистамином заключается в том, что в их структуру входит имидазольное кольцо (оно может быть метилировано в 4-м положении). Отличаются же они тем, что имеют хотя и полярную, но не заряженную боковую цепь. Возможно, что отсутствие у них гистаминомиметической активности связанно именно с незаряженностью боковой цепи.

Клиническое применение циметидина выявило его выраженную рецепторопосредованную антиандрогенную активность, выражающуюся в развитии гинекомастии и импотенции у 50% больных. В настоящее время созданы более эффективные препараты со сниженной антиандрогенной активностью — ранитидин, фамотидин (квамател). Наиболее эффективным препаратом данной группы является фамотидин, у которого отсутствует антиандрогенная активность. Фамотидин в 40 раз мощнее циметидина и в 8 раз — ранитидина. В клинике различия в силе действия определяются данными об эквивалентности доз разных H_2-блокаторов, воздействующих на снижение секреции соляной кислоты. суточная доза 40 мг против 300 для ранитидина. Изучение влияния H_2-блокаторов на кислую желудочную секрецию у людей и животных *in vivo* и *in vitro* показало, что они представляют собой эффективные ингибиторы секреции индуцируемой любыми стимулами. Кроме того, H_2-блокаторы имеют дополнительные механизмы действия, связанные с их способностью частично повышать синтез простагландинов в слизистой желудка, что, в свою очередь, может приводить к активизации кровотока в слизистой желудка и повышению синтеза бикарбонатов, нейтрализующих соляную кислоту желудочного сока; способствуют восстановлению (регенерации) клеток повреждённого эпителия в зоне эрозии или язвенного дефекта; возможно, стимулируют продукцию слизи и повышает тонус нижнего сфинктера пищевода (в частности, ранитидин), что особенно важно для устранения изжоги. Показана выраженая клиническая эффективность фамотидина при остром и хроническом панкреатите.

Антисекреторный эффект H_2-антагонистов позволяет применять их для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, причиной которых является повышение

образования соляной кислоты и пепсина. Ввиду значительного антисекреторного эффекта H_2-блокаторы могут влиять на pH-зависимое всасывание лекарств-электролитов, изменяя их ионизацию и степень диффузии. Так, циметидин снижает всасывание кетоконазола, антипирина, аминазина, препаратов железа. Во избежание возможного нарушения всасывания в желудке другие лекарственные препараты рекомендуется назначать за 1–2 ч до приёма H_2-блокаторов. Всасывание H_2-блокаторов может снижаться до 30% при совместном приёме с алюминийсодержащими антацидами, а также сукральфатом. Антациды целесообразно применять через 2 ч после H_2-блокаторов.

Разные препараты этой группы вызывают побочные эффекты с разной частотой. При применении циметидина она составляет 3,2%, ранитидина — 2,7%, фамотидина — 1,3. Фамотидин мало проникает в системный кровоток и вызывает минимальные побочные эффекты. Фамотидин и другие H_2-блокаторы оказывает специфическое побочное действие преимущественно на желудочно-кишечный тракт — развиваются или диарея, или (реже) запор.

Диарея — результат антисекреторного действия. Уменьшение продукции соляной кислоты повышает pH в желудке, что препятствует превращению пепсиногена в пепсин, участвующий в расщеплении белков пищи. Кроме того, уменьшение продукции желудочного сока, а также блокада H_2-рецепторов поджелудочной железы становятся причиной снижения выделения пищеварительных ферментов поджелудочной железой и желчи. Всё это приводит к нарушению процесса пищеварения и развитию диареи. Однако частота этих осложнений невелика (для фамотидина — 0,03–0,4%) и обычно не требует прекращения лечения. Подобные эффекты свойственны всем H_2-блокаторам. Они дозозависимы и их можно ослабить, снизив дозы препарата.

H_2-блокаторы могут вызывать гематологические побочные эффекты, связанные с идиосинкразией. Возникают они обычно в первые 30 дней лечения, носят обратимый характер и чаще всего проявляются тромбоцитопенией и гранулоцитопенией. При использовании фамотидина их наблюдают у 0,06–0,32% больных.

Нарушения деятельности эндокринной системы обусловлены способностью H_2-блокаторов вытеснять из связи с рецепторами эндогенный тестостерон, а также лекарственные препараты, содержащие этот гормон, приводя к расстройствам половой сферы (импотенция, гинекомастия). Эти побочные эффекты тоже дозозависимы. Фамотидин вызывает их гораздо реже, чем циметидин и ранитидин.

H_2-блокаторы могут нарушать функцию сердечно-сосудистой системы, блокируя H_2-рецепторы миокарда, сосудистой стенки. У страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями и пожилых больных они способны вызывать аритмии, усиливать сердечную недостаточность, провоцировать коронароспазм.

Гипотензия иногда наблюдается при внутривенном введении циметидина.

Гепатотоксичность H_2-блокаторов, проявляющаяся гипертрансаминаземией, гепатитом, нарушением активности цитохрома P-450, связана с метаболизмом H_2-блокаторов в печени. Это наиболее характерно для циметидина. При применении фамотидина в связи с его незначительным метаболизмом частота подобных осложнений минимальна.

Нарушения сознания и психики — результат проникновения H_2-блокаторов через гематоэнцефалический барьер. Степень проникновения в центральную нервную систему циметидина равна 0,24, ранитидина — 0,17, фамотидина — 0,12% от содержания препарата в крови. Нейротропные неблагоприятные реакции более часто возникают у пожилых людей и при нарушениях функции печени и почек, а также при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера. Частота их составляет 0,05–0,1%.

H_2-блокаторы могут ухудшать течение бронхообструктивных заболеваний, приводя к бронхоспазму. Возможны и аллергические реакции по типу крапивницы. Частота появления кожной сыпи после приёма фамотидина — 0,1–0,2 %.

Побочный эффект, свойственный всем H_2-блокаторам независимо от их фармакокинетических свойств, — развитие синдрома отмены. Поэтому рекомендуется дозы снижать постепенно.

Лечение язвенной болезни с помощью антигистаминных средств началось после создания первого избирательного антагониста H_2-рецепторов буримамида [3]. Через несколько лет были синтезированы ещё два соединения этого ряда — метиамид и циметидин.

Изучение влияния буримамида, метиамида и циметидина на желудочную секрецию соляной кислоты у людей и животных *in vivo* и *in vitro* показало, что они представляют собой эффективные ингибиторы секреции, индуцируемой любыми стимулами.

Буримамид заметно влияет на интенсивность желудочной секреции только при внутривенном введении. При пероральном введении он малоэффективен, по-видимому вследствие быстрой инактивации в желудочно-кишечном тракте. Неспособность буримамида вызывать выраженный фармакологический эффект при пероральном введении ограничивает возможность его применения в практике. От подобного недостатка свободны метиамид, который медленно абсорбируется из желудка, но полностью всасывается в тонком кишечнике, и циметидин, быстро всасывающийся в желудочно-кишечном тракте.

Циметидин и метиамид имеют количественное и качественное сходство по фармакологическим свойствам, однако они различаются по токсичности.

В ряде случаев применение метиамида сопровождалось деструкцией паренхимы почек и печени, небольшой гиперплазией щитовидной железы, нейтропенией и агранулоцитозом. Возможно, что это связано с наличием в молекуле метиамида тиомочевины. Циметидин, у которого тиомочевина заменена на цианогуанидин, лучше растворяется и не вызывает приведённых выше побочных эффектов, поэтому в клинике первым H_2-антагонистом, получившим широкое распространение, стал циметидин. Впоследствие появились другие препараты этого ряда — ранитидин, фамитидин, низатидидин, отличающиеся ещё более лучшей переносимостью.

Если циметидин, ранитидин, фаматидин и низатидин примерно в равной степени ингибируют кислотную секрецию желудка, то они имеют различную фармакологическую активность, не связанную с взаимодействием с H_2-рецепторами. В отличие от фамотидина и низатидина циметидин и в гораздо меньшей степени ранитидин ингибируют окислительную систему метаболизма ксенобиотиков при участии цитохрома Р-450 и поэтому увеличивают активность многих ЛВ. Из указанных гистминовых антагонистов только циметидин метаболизируется этой же системой, связывается с андрогеновыми рецепторами и вызывает антиандрогеновые эффекты: гинекомастию у мужчин и галокторею у женщин. У мужчин, принимающих большие дозы циметидина, наблюдается уменьшение количества спермы и обратимая импотенция.

Антисекреторный эффект H_2-антагонистов позволит их применять для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, причиной которых является повышение образования HCl и пепсина; отмечен высокий терапевтический эффект H_2-антагонистов при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, эрозивного гастрита.

Определённое значение в лечении язвенной болезни может иметь и способность H_2-антагонистов уменьшать выброс гормонов надпочечников при стрессе, о чём сообщалось.

5.8. Антагонисты H_3-рецепторов

Применение гистаминергических препаратов для лечения приступов головокружения (вертиго) и других функциональных расстройств внутреннего уха (болезни Меньера), основанное на сосудорасширяющем действии гистамина, было широко распространено в прошлом, поскольку считалось, что указанные патологии имеют сосудистое происхождение. Первое исследование агонистов гистамина было предпринято, главным образом, с целью определить эффективность этих соединений для лечения больных, страдающих заболеваниями, поддающихся лечению гистамином. Наиболее эффективным препаратом из указанной группы оказался бетагистин дигидрохлорид (Бетасерк).

О первом опыте клинического использования бетагистина сообщил B. T. Norton (1962), который применял препарат для лечения больных, страдающих мигренью и головокружением. Он обнаружил, что бетагистин оказывает терапевтическое действие, профиль которого во многом совпадает с профилем действия гистамина. Бетагистин, в отличие от гистамина, оказывается эффективным при пероральном приёме. В настоящее время считается, что бетагистин, устраняет головокружение, являясь агонистом рецепторов H_1 и антагонистом рецепторов H_3, а его влияние на мозговой кровоток обусловлено тем, что он действует как агонист рецепторов H_1. Препараты, которые являются антагонистами рецепторов H_3, имеют особую ценность для лечения больных, страдающих головокружением, поскольку они не вызывают седации и сонливости, а значит, не нарушают процессы центральной компенсации вестибулярной функции. Блокируя H_3-рецепторы, бетагистин увеличивает высвобождение гистамина и других нейромедиаторов из нервных окончаний, снижает электрическую активность вестибулярных ядер в стволе головного мозга, что обусловлено повышением ряда нейромедиаторов (в том числе серотонина), выделение которых опосредуется H_3-рецепторами. Действие препарата выражается в существенном снижении частоты приступов головокружения (вертиго), что можно отнести за счёт изменения кровотока в мозге или лабиринте. Это профилактическое действие бетагистина может быть особенно важным при болезни Меньера и рецидивирующем головокружении. Снижение частоты и тяжести приступов вертиго может предотвратить дальнейшее развитие повреждения во внутреннем ухе.

5.9. Антагонисты H_4-рецепторов

Открытие гистаминовых H_4-рецепторов в некоторых клетках кожи и крови, обнаружение их роли в воспалительных реакциях дали новый импульс к исследованиям роли гистамина в воспалении. Эксперименты на животных свидетельствуют о том, что антагонисты H_4-рецепторов могут оказаться весьма полезными для лечения тех аллергических и воспалительных заболеваний, при которых H_1-анитагонисты мало или совсем не эффективны [74–87].

Таким образом, приведённые сведения показывают, что в последнее время фармако-биохимические исследования структуры и функции гистаминовых рецепторов являются неотъемлемой частью работ в области молекулярной фармакологии рецепторов для нейромедиаторных веществ. Доказана гетерогенность гистаминовых рецепторов; общепринято их деление на H_1-, H_2- H_3 и H_4-рецепторы.

Получены данные о биохимических изменениях в клетках, возникающих после активации данных рецепторов. В частности, выявлено изменение уровня цАМФ или цГМФ, вызываемое гистамином и его аналогами, что является значительным прогрессом в наших представлениях о механизме их действия на клеточном уровне.

Применение методики радиолигандного связывания позволило установить прямое взаимодействие ряда психотропных средств с гистаминовыми рецепторами в ЦНС и высказать предположение о связи седативных и поведенческих эффектов этих веществ с блокадой H_1- и H_2-рецепторов. Особый интерес представляет возможность создания селективных блокаторов периферических H_1- и H_4-рецепторов, не проникающих в ЦНС и не оказывающих седативного действия, для лечения аллергических заболеваний.

Большое будущее, по-видимому, у селективных H_2-антагонистов как эффективных противоязвенных средств. В то же время необходимо проанализировать возможность их использования для терапии аллергии и бронхиальной астмы, поскольку лечение этих заболеваний только H_1-антагонистами не всегда даёт положительные результаты.

Итак, подводя итоги рассмотрению трансформации молекулярного сигнала гистамина, его производных и некоторых ЛВ посредством различных гистаминовых рецепторов, можно заключить, что дальнейшие успехи терапии не только перечисленных заболеваний, но и ряда других (патология заживления ран, аномалия развития плода, злокачественные перерождения), в патогенезе которых гистамину принадлежит важная роль, во многом будут связаны как с исследованием молекулярной природы гистаминовых рецепторов и биохимических принципов их функционирования, так и с синтезом более специфических лигандов этих рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 5

1. *Hilla S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M., Schunack W., Levi R., Haas H.L.* // International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. Pharmacology Reviews. 1997. V. 49, № 3. P. 253–278.
2. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М.–Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.
3. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. — 384 с.
4. *Ohki E., Suzuki M., Aoe T., Ikawa Y., Negishi E., Ueno K.* Expression of histamine H_4 receptor in synovial cells from rheumatoid arthritic patients // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30, № 11. P. 2217–20.
5. *Bell J.K., McQueen D.S., Rees J.L.* Involvement of histamine H_4 and H_1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142, № 2. P. 374–80.
6. *Gbahou F., Rouleau A., Morisset S., Parmentier R., Crochet S., Lin J.S., Ligneau X., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C.R., Schwartz J.C., Arrang J.M.* Protean agonism at histamine H_3 receptors in vitro and in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 16, № 100(19). P. 11086–91.
7. *Jablonowski J.A., Grice C.A., Chai W., Dvorak C.A., Venable J.D., Kwok A.K., Ly K.S., Wei J., Baker S.M., Desai P.J., Jiang W., Wilson S.J., Thurmond R.L., Karlsson L., Edwards J.P., Lovenberg T.W., Carruthers N.I.* The first potent and selective non-imidazole human histamine H_4 receptor antagonists // J. Med. Chem. 2003. V. 11, № 46(19). P. 3957–60.
8. *Haas H., Panula P.* The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system // Nature Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 121–130.
9. *Liu C., Wilson S.J., Kuei C., Lovenberg T.W.* Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H_4 receptors reveals substantial pharmacological species variation // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. V. 299. P. 121–130.
10. *Oda T. et al.* cDNA cloning and characterization of porcine histamine H_4 receptor // Biochim. Biophy. Acta. 2002. V. 1575. P. 135–138.
11. *Oda T. et al.* Molecular cloning of monkey histamine H_4 receptor // J. Pharmacol. Sci. 2005. V. 98. P. 319–322.
12. *Bakker R.A., Timmerman H., Leurs R.* Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction // Clin. Allergy Immunol. 2002. V. 17. P. 27–64.
13. *Leurs R., Bakker R.A., Timmerman H., de Esch I.J.P.* The histamine H_3 receptor: from gene cloning to H_3 receptor drugs // Nature Rev. Drug Discov. 2005. V. 4. P. 107–120.
14. *de Esch I.J.P., Thurmond R.L., Jongejan A., Leurs R.* The histamine H_4 receptor as a new therapeutic target for inflammation // Trends Pharmacol. Sci. 2005. V. 26. P. 462–469.
15. *Morse K.L. et al.* Cloning and characterization of a novel human histamine receptor // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. V. 296. P. 1058–1066.
16. *Gutzmer R. et al.* Histamine H_4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 5224–5232.
17. *Teuscher C. et al.* Central histamine H_3 receptor signaling negatively regulates susceptibility to autoimmune inflammatory disease of the CNS // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 10146–10151.

18. *Lim H.D. et al.* Evaluation of histamine H_1-, H_2-, and H_3-receptor ligands at the human histamine H_4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H_4 receptor agonist // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. V. 314. P. 1310–1321.
19. *Venable J.D., Thurmond R.L.* Development and chemistry of histamine H_4 receptor ligands as potential modulators of inflammatory and allergic responses // Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem. 2006. V. 5. P. 307–322.
20. *Nguyen T. et al.* Discovery of a novel member of the histamine receptor family // Mol. Pharmacol. 2001. V. 59. P. 427–433.
21. *Hough L.B.* Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors // Mol. Pharmacol. 2001. V. 59. P. 415–419.
22. *Nakayama T. et al.* Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H_4 receptor // J. Immunol. V. 2004. V. 173. P. 2078–2083.
23. *Thurmond R.L. et al.* A potent and selective histamine H_4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. V. 309. P. 404–413; Effects of histamine H_4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat // Eur. J. Pharmacol. 2005. V. 522. P. 130–138.
24. *Dunford P.J. et al.* The histamine H_4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of C. $D4^+$ T cells // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 7062–7070.
25. *Dunford P.J. et al.* Histamine H_4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 119. P. 176–183.
26. *Coruzzi G., Adami M., Guaita E., de Esch I.J.P., Leurs R.* Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H_4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation // Eur. J. Pharmacol. 2007. V. 563. P. 240–244.
27. *Takeshita K., Sakai K., Bacon K.B., Gantner F.* Critical role of histamine H_4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 307. P. 1072–1078.
28. *Triggiani M. et al.* Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H_1 receptor // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 119. P. 472–481.
29. *Dijkstra D. et al.* Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H_4 receptor // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 120. P. 300–307.
30. *Hofstra C.L., Desai P.J., Thurmond R.L., Fung-Leung W.-P.* Histamine H_4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 1212–1221.
31. *Lippert U. et al.* Human skin mast cells express H_2 and H_4, but not H_3 receptors // J. Invest. Dermatol. 2004. V. 123. P. 116–123.
32. *Godot V. et al.* H_4 Histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12 // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 120. P. 827–843.
33. *Garcia-Martin E. et al.* Severity of ulcerative colitis is associated with a polymorphism at diamine oxidase gene but not at histamine *N*-methyltransferase gene // World J. Gastroenterol. 2006. V. 12. P. 615–620.
34. *Ling P. et al.* Histamine H_4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142. P. 161–171.
35. *Buckland K.F., Williams T.J., Conroy D.M.* Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H_4 receptor // Br. J. Pharmacol. 2003. V. 140. P. 1117–1127.
36. *Vancheri C. et al.* The effect of fexofenadine on expression of intercellular adhesion molecule 1 and induction of apoptosis on peripheral eosinophils // Allergy Asthma Proc. 2005. V. 26. P. 292–298.
37. *Miyake K., Ohmori K., Ishii A., Karasawa A.* Inhibitory effect of olopatadine hydrochloride (KW-4679), a novel antiallergic drug, on peptide leukotriene release from human eosinophils // Allergol. Int. 2001. V. 50. P. 113–116.

38. *Idzko M. et al.* Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells // J. Allergy Clin. Immunol. 2002. V. 109. P. 839–846.
39. *Renkl A. et al.* Distinct effects of sphingosine-1-phosphate, lysophosphatidic acid and histamine in human and mouse dendritic cells // Int. J. Mol. Med. 2004. V. 13. P. 203–209.
40. *Gutzmer R. et al.* Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells // J. Allergy Clin. Immunol. 2002. V. 109. P. 524–531.
41. *Mazzoni A. et al.* Histamine inhibits IFN-α release from plasmacytoid dendritic cells // J. Immunol. 2003. V. 170. P. 2269–2273.
42. *Theiner G., Gessner A., Lutz M.B.* The mast cell mediator PGD2 suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to T_{H_2} polarized immune responses in vivo // Immunobiology. 2006. V. 211. P. 463–472.
43. *Caron G. et al.* Histamine polarizes human dendritic cells into T_H2 cell-promoting effector dendritic cells // J. Immunol. 2001. V. 167. P. 3682–3686.
44. *McIlroy A. et al.* Histamine and prostaglandin E2 up-regulate the production of T_H2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-γ-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells // Immunology. 2006. V. 117. P. 507–516.
45. *Jutel M. et al.* Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H_1 and H_2 receptors // Nature. 2001. V. 413. P. 420–425.
46. *Bryce P.J. et al.* The H_1 histamine receptor regulates allergic lung responses // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. P. 1624–1632.
47. *Nakane H., Sonobe Y., Watanabe T., Nakano K.* Histamine: Its novel role as an endogenous regulator of Con A-dependent T cell proliferation // Inflamm. Res. 2004. V. 53. P. 324–328.
48. *Kunzmann S. et al.* Histamine enhances TGF-β1-mediated suppression of T_H2 responses // FASEB J. 2003. V. 17. P. 1089–1095.
49. *Osna N., Elliott K., Khan M.M.* Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in T_{H_2} cells and splenocytes // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. P. 85–96.
50. *Kobayashi T., Koga R., Banu Y., Watanabe T.* Immediate-type hypersensitivity and helper T cell function in histamine H_1 receptor- and H_2 receptor-deficient mice // Int. Congr. Series. 2001. V. 1224. P. 395–396.
51. *Sonobe Y., Nakane H., Watanabe T., Nakano K.* Regulation of Con A-dependent cytokine production from C. $D4^+$ and C. $D8^+$ T lymphocytes by autosecretion of histamine // Inflamm. Res. 2004. V. 53. P. 87–92.
52. *Gantner F. et al.* Histamine H_4 and H_2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human C. $D8^+$ T cells // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. V. 303. P. 300–307.
53. *Takahashi H.K. et al.* Histamine downregulates C. D14. expression via H_2 receptors on human monocytes // Clin. Immunol. 2003. V. 108. P. 274–281.
54. *Takahashi H.K. et al.* Histamine inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-18 production in human monocytes // Clin. Immunol. 2004. V. 112. P. 30–34.
55. *Marone G., Gentile M., Petraroli A., De Rosa N., Triggiani M.* Histamine-induced activation of human lung macrophages // Int. Arch. Allergy Immunol. 2001. V. 124. P. 249–252.
56. *Triggiani M. et al.* Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H_1 receptors // J. Immunol. 2001. V. 166. P. 4083–4091.
57. *Zabner J. et al.* Histamine alters E-cadherin cell adhesion to increase human airway epithelial permeability // J. Appl. Physiol. 2003. V. 95. P. 394–401.
58. *Takeuchi K., Kishioka C., Ishinaga H., Sakakura Y., Majima Y.* Histamine alters gene expression in cultured human nasal epithelial cells // J. Allergy Clin. Immunol. 2001. V. 107. P. 310–314.
59. *Wagner M.C., Eckman J.R., Wick T.M.* Histamine increases sickle erythrocyte adherence to endothelium // Br. J. Haematol. 2006. V. 132. P. 512–522.
60. *Talreja J., Kabir M.H., Filla M.B., Stechschulte D.J., Dileepan K.N.* Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to

Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components // Immunology. 2004. V. 113. P. 224–233.

61. *Mueller T. et al.* Functional characterization of histamine receptor subtypes in a human bronchial epithelial cell line // Int. J. Mol. Med. 2006. V. 18. P. 925–931.
62. *Matsubara M., Ohmori K., Hasegawa K.* Histamine H_1 receptor-stimulated interleukin 8 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by bronchial epithelial cells requires extracellular signal-regulated kinase signaling via protein kinase C // Int. Arch. Allergy Immunol. 2006. V. 139. P. 279–293.
63. *Braman S.S.* The global burden of asthma // Chest. 2006. V. 130. P. 4S–12S.
64. *Busse W. W., Lemanske R.F.* Asthma // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. P. 350–362.
65. *Pascual R.M., Peters S.P.* Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview // J. Allergy Clin. Immunol. 2005. V. 116. P. 477–486.
66. *O'Byrne P.M., Parameswaran K.* Pharmacological management of mild or moderate persistent asthma // Lancet. 2006. V. 368. P. 794–803.
67. *Bryce P.J., Geha R., Oettgen H.C.* Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112. P. 149–158.
68. *Blumchen K. et al.* Oral administration of desloratadine prior to sensitization prevents allergen-induced airway inflammation and hyper-reactivity in mice // Clin. Exp. Allergy. 2004. V. 34. P. 1124–1130.
69. *Miyamoto K. et al.* Histamine type 1 receptor deficiency reduces airway inflammation in a murine asthma model // Int. Arch. Allergy Immunol. 2006. V. 140. P. 215–222.
70. *Gelfand E. W., Cui Z.-H., Takeda K., Kanehiro A., Joetham A.* Fexofenadine modulates T-cell function, preventing allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness // J. Allergy Clin. Immunol. 2002. V. 110. P. 85–95.
71. *Gelfand E. W., Cui Z.-H., Takeda K., Kanehiro A., Joetham A.* Effects of fexofenadine on T-cell function in a murine model of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112. P. S. 89–S. 95.
72. *Xu X. et al.* Neutrophil histamine contributes to inflammation in mycoplasma pneumonia // J. Exp. Med. 2006. V. 203. P. 2907–2917.
73. *Andrew D., Craig A.D.* Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch // Nature Neurosci. 2001. V. 4. P. 72–77.
74. *Han S.-K., Mancino V., Simon M.I.* Phospholipase Cβ 3 mediates the scratching response activated by the histamine H_1 receptor on C-fiber nociceptive neurons // Neuron. 2006. V. 52. P. 691–703.
75. *Nicolson T.A., Bevan S., Richards C.D.* Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurones // Neuroscience. 2002. V. 110. P. 329–338.
76. *Nakaya M., Takeuchi N., Kondo K.* Immunohistochemical localization of histamine receptor subtypes in human inferior turbinates // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 2004. V. 113. P. 552–557.
77. *Breunig E. et al.* Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H_1, H_2, H_3 and H_4 receptors // J. Physiol. 2007. V. 583. P. 731–742.
78. *Paus R., Schmelz M., Biro T., Steinhoff M.* Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. P. 1174–1185.
79. *Yanai K., Tashiro M.* The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight from human positron emission tomography studies // Pharmacol. Ther. 2007. V. 113. P. 1–15.
80. *Sakurada S. et al.* Intrathecal histamine induces spinally mediated behavioral responses through tachykinin NK1 receptors // Pharmacol. Biochem. Behav. 2003. V. 74. P. 487–493.
81. *Munday J. et al.* Chlorpheniramine is no more effective than placebo in relieving the symptoms of childhood atopic dermatitis with a nocturnal itching and scratching component // Dermatology. 2002. V. 205. P. 40–45.

82. *Imaizumi A., Kawakami T., Murakami F., Soma Y., Mizoguchi M.* Effective treatment of pruritus in atopic dermatitis using H_1 antihistamines (second-generation antihistamines): changes in blood histamine and tryptase levels // J. Dermatol. Sci. 2003. V. 33. P. 23–29.
83. *Bell J.K., McQueen D.S., Rees J.L.* Involvement of histamine H_4 and H_1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in BalbC mice // Br. J. Pharmacol. 2004. V. 142. P. 374–380.
84. *Sugimoto Y., Nakamura Y., Alejandra Hossen M., Watanabe T., Kamei C.* Evaluation of the effects of anti-pruritic drugs on scratch responses using histamine H_1 receptor-deficient mice // Eur. J. Pharmacol. 2003. V. 470. P. 113–116.
85. *Akamatsu H. et al.* The effect of fexofenadine on pruritus in a mouse model (HR-ADf) of atopic dermatitis // J. Int. Med. Res. 2006. V. 34. P. 495–504.
86. *Hossen M.A. et al.* Effect of loratadine on mouse models of atopic dermatitis associated pruritus // Int. Immunopharmacol. 2005. V. 5. P. 1331–1336.
87. *Sugata Y. et al.* Histamine H_4 receptor agonists have more activities than H_4 agonism in antigen-specific human T-cell responses // Immunology. 2007. V. 121. P. 266–275.
88. *Thurmond R.L., Gelfand E.W., Dunford P.J.* The role of histamine H_1 and H_4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines // Nature Reviews Drug Discovery. 2008. V. 7. P. 41–53.

Глава 6

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ

Исследования механизмов действия белково-пептидных гормонов за последние десятилетия привели к созданию теории реализации их биологической активности. Основное положение этой теории связано с понятием «рецепторы», которые ответственны за специфическое связывание белково-пептидных гормонов и преобразование гормонального сигнала в тот или иной вид биохимической и физиологической реакции.

Ряд экспериментальных фактов (активация аденилатциклазы гормонами, ковалентно связанными с сефарозой, инактивация трипсином способности клеток связывать с высоким сродством тропный гормон и др.), свидетельствует о локализации данных рецепторов на плазматических мембранах компетентных клеток. В то же время с помощью методов электронно-плотных меток и авторадиографии была показана возможность проникновения белково-пептидных гормонов в клетки путём пиноцитоза (т. е. интернализации) и существование для них внутриклеточных рецепторов.

Нами проводились исследования некоторых аспектов функционирования рецепторов белково-пептидных гормонов, направленные на выяснение роли конформационных перестроек мембран в реализации физиологической активности этого класса соединений.

Данная глава посвящена анализу собственных и современных литературных данных о локализации, химической природе, обмене и функциональной активности рецепторов белково-пептидных гормонов в норме и патологии, а также о молекулярных механизмах взаимодействия гормонов с рецепторами.

6.1. Белково-пептидные гормоны — специфические регуляторы

К гормонам, имеющим белково-пептидную структуру, относятся гормоны гипофиза, поджелудочной и щитовидной желёз, рилизинг-факторы гипоталамуса. Передняя доля гипофиза секретирует адренокортикотропный гормон (АКТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), липотропный гормон (ЛТГ), соматотропный гормон (СТГ), тиреотропный гормон (ТТГ), лактогенный гормон (ЛТГ), или пролактин, лютеинизирующий гормон (ЛГ). В промежуточной доле вырабатывается меланоцитстимулирующий гормон (МСГ), в задней — окситоцин и вазопрессин. В щитовидной железе образуется тиреокальцитонин, в паращитовидной железе — паратгормон, в поджелудочной инсулин и глюкагон. Кроме того, с некоторыми оговорками к гормонам можно отнести и другие физиологически активные пептиды: ангиотензины, субстанцию Р, брадикинин, нейротензин, вазоактивный пептид кишечника, соматомедины, нейромедин К, нейропептид У, холецистокинин, гастрин, интерлейкины, тромбин, секретин, факторы роста, активин, ингибин, эритропоэтин, интерфероны, онкостатин, факторы некроза опухолей и др.

По химическому строению большинство из них представляет собой простые пептиды, образованные одной пептидной цепью, в состав которой входит различное число аминокислотных остатков: от 3 в тиреотропин-рилизинг-факторе до 198 в ЛТГ. В отличие от других белково-пептидных гормонов молекула инсулина состоит из двух пептидных цепей, связанных между собой дисульфидными мостиками. К сложным белкам — гликопротеинам — относятся ЛГ, ФСГ, ТТГ.

После коррелятивного анализа аминокислотной последовательности некоторых белково-пептидных гормонов и кининов было обращено внимание на то, что данные соединения содержат фрагменты, включающие от 2 до 5 идентичных или сходных аминокислот.

Эти участки названы общими фрагментами. Общие структурные фрагменты отражают определённую закономерность, поскольку статистическая вероятность нахождения двух, а тем более трёх и более в одинаковой последовательности, одинаковых аминокислот в структурах различных пептидов незначительна. Общие фрагменты, по-видимому, ответственны за общность действия ряда белково-пептидных гормонов, выражающегося в индукции изменения активности аденилатциклазы.

В то же время в структуре каждого гормона можно выделить центры, определяющие их взаимодействие только с клетками-мишенями и специфику их действия. В литературе принято назвать их гофманскими центрами [1].

Особенностью белково-пептидных гормонов по сравнению с лигандами других рецепторов является существование у них третичной структуры, что во многом осложняет определение участков молекул, ответственных за связывание с рецепторами и за обеспечение трансформации биологической активности гормонов внутри клетки.

6.2. Молекулярные механизмы взаимодействия белково-пептидных гормонов с рецепторами

Определение параметров связывания гормонов с рецепторами необходимо для идентификации рецепторов и получения информации об их функционировании. Взаимодействие данных гормонов с рецепторами характеризуется быстротой, обратимостью, зависимостью от температуры, величины pH, присутствия одновалентных и двухвалентных катионов и гуаниновых нуклеотидов, в ряде случаев кооперативностью и наличием специфических и неспецифических участков связывания. Кинетика гормон-рецепторного взаимодействия зависит от температуры и концентраций молекул-партнёров. При 37 °С равновесное состояние обычно достигается в течение нескольких минут, а при более низких температурах оно может не наступать даже по истечении нескольких часов.

При взаимодействии белково-пептидных гормонов с рецепторами может иметь место отрицательная или положительная кооперативность связывания, либо её может не быть. Отрицательная кооперативность, сопровождающаяся снижением сродства рецепторов к гормонам, в большинстве случаев обусловлена увеличением скорости диссоциации комплекса гормон–рецептор. Кооперативный эффект сохраняется при солюбилизации рецепторов инсулина. В случае инсулинового рецептора отрицательный кооперативный эффект характеризуется снижением размеров солюбилизированного рецептора, вероятно, вследствие диссоциации субъединиц и уменьшения сродства к гормону в 10 раз.

Обработка клеток панкреотических островков (Лангерганса) крысы трипсином (6 ЕД/мл), нейраминидазой (100 ЕД/мл), 1-этил-3-(диметиламинопропил)карбодиимидом (20 мМ), тетранитрометаном (5 мМ) и 1,3-дифтор-4,2-динитробензо-

лом приводит к снижению B_{max} взаимодействия ^{125}I-инсулина с этими клетками с $0{,}58 \cdot 10^{-17}$ М на один островок до 0,36, 0,30, 0,14, 0,08 и $0{,}33 \cdot 10^{17}$ М на один островок соответственно. Трипсин, кроме того, увеличивал $K_д$ с 0,4 до 8,3 нМ. Обработка клеток всеми перечисленными агентами снижала их чувствительность к ингибирующему эффекту экзогенного инсулина на секрецию островка инсулина. В то же время обработка данных клеток фосфолипазой A_2 не влияла на параметры связывания инсулина и его биологическое действие. Дитионитробензол (0,5 мМ) и *n*-хлорбензоат ртути (тривиальное название — *n*-хлормеркурийбензоат) (0,5 мМ) увеличивали B_{max} до 1,88 и $1{,}2 \cdot 10^{-17}$ моля на один островок и $K_д$ до 5,8 и 2,6 нМ соответственно, не изменяя чувствительности секреции клетками инсулина к экзогенному инсулину. Можно полагать, что аминогруппы, сиаловые кислоты, карбоксильные группы и тирозиновые гидроксилы, но не SH-группы и не фосфолипиды, участвуют во взаимодействии инсулина с рецептором клеток панкреатических островков. По-видимому, уменьшение числа инсулиновых рецепторов сопровождается уменьшением физиологического ответа клеток на инсулин.

При анализе количественных взаимоотношений между связыванием гормонов с рецепторами и их биологическим действием было показано, что ответ тканей-мишеней прямо пропорционален числу занятых рецепторных мест при низких концентрациях гормонов. Максимальный ответ часто достигается при насыщении небольшого числа рецепторов, т. е. существуют «запасные» или «резервные» рецепторы в соответствии с теорией рецепции Стефенсона [1]. Например, максимальная стимуляция инсулином окисления глюкозы или липогенеза в жировой ткани наблюдается в равновесных условиях при занятости лишь 2% всех имеющихся рецепторов.

Обработка мембран плаценты фосфолипазой снижает вязкость мембраны и вызывает увеличение связывания ^{125}I-инсулина за счёт повышения числа связывающих участков. Скорость диссоциации ^{125}I-инсулина при 4 °С и при 24 °С была ниже у обработанных фосфолипазой мембран, чем у контрольных. Следовательно, можно считать, что обработка мембран фосфолипазой увеличивает подвижность рецепторов инсулина при 24 °С, но не при 4 °С (это позволяет рецепторам или их субъединицам образовывать большие агрегаты и увеличивает сродство к инсулину), причём степень агрегации рецепторов регулирует их сродство к инсулину и, по крайней мере частично, определяет отрицательную кооперативность связывания инсулина.

Увеличение количества фосфолипидов с ненасыщенными связями в плазматических мембранах асцитных клеток Эрлиха приводит к увеличению числа инсулиновых рецепторов, но и к уменьшению их сродства. Напротив, увеличение содержания фосфолипидов с насыщенными связями сопровождалось уменьшением числа инсулиновых рецепторов и повышением их сродства к гормону.

При изучении кинетики диссоциации комплекса тиреотропин–рецептор мембран нормальной щитовидной железы человека, установлено, что диссоциация связанного ^{125}I-тиреотропина двухфазна: $t'_{1/2} = 1{,}6$ мин, $t''_{1/2} = 86$ мин. Диссоциация ускорялась при добавлении 0,15 М NaCl или 0,1 М $MgCl_2$ и оставалась двухфазной. Медленно диссоциирующий компонент был более чувствителен к солям, чем быстро диссоциирующий компонент. Доля медленно диссоциирующего компонента повышалась при увеличении времени инкубации при 25 °С, но не при 0 °С. Авторы полагают, что это происходит в результате формирования способных быстро диссоциировать комплексов ^{125}I-тиреотропин–рецептор, которые при длительном существовании превращаются в медленно диссоциирующие комплексы вследствие диссоциации аденилатциклазы, сопряжённой с рецепторами, либо в связи с конформационными переходами рецепторов. Другими словами, связывание пептидных гормонов с рецепторами не может быть описано как простая обратимая биомолекулярная реакция.

Неоднократно было показано, что гуаниновые нуклеотиды могут выступать в качестве аллостерических регуляторов рецепторов белково-пептидных гормонов, изменяя связывание лигандов и биологический ответ. ГТФ стимулирует диссоциацию комплексов глюкагона, ангиотензина и вазопрессина с рецепторами. ГТФ снижает сродство вазопрессина и ангиотензина II к рецепторам мембран клеток печени крыс, но не влияет на связывание антагонистов этих гормонов. Связывание ангиотензина II и глюкагона эффективно подавляется ГТФ в микромолярных концентрациях, а вазопрессина в миллимолярных. Негидролизуемый аналог ГТФ *о*-гуанилимидодифосфат действует на ангиотензиновые рецепторы аналогично ГТФ, но не влияет на вазопрессиновые рецепторы. Предполагается, что снижение сродства вазопрессина к его рецепторам в присутствии ГТФ обусловлено их фосфорилированием.

Связывание белково-пептидных гормонов с рецепторами зависит от величины pH и концентрации двухвалентных и в ряде случаев одновалентных катионов. Более того, ингибирование гуаниновыми нуклеотидами связывания ^{125}I-ангиотензина II с мембранами печени крыс требует присутствия катиона — Mg^{2+} или Na^{+}.

Рецепторы для вазоактивных полипептидов (ангиотензин, вазопрессин, брадикинин, субстанция P и нейротензин) присутствуют в артериях, венах и сердце. Они опосредуют влияние пептидов на периферическое сопротивление сосудов, тонус вен, частоту сокращений сердца и коронарный кровоток. Некоторые данные о сродстве этих пептидов к сосудистым рецепторам и характере вызываемых ими эффектов представлены на табл. 6.1.

Сосудистые эффекты всех пептидов непосредственно обусловлены их взаимодействием с рецепторами, за исключением нейротензина, действие которого на портальную вену было опосредовано простагландинами.

Ангиотензин. Агиотензиновые рецепторы выявлены в сосудах кишечнике, головном мозге, почках и надпочечниках Ангиотензин выполняет двойственную функцию: как истинный гормон, циркулирующий в крови, и как эффекторный пептид, высвобождающийся из ангиотензинергических нейронов и выступающий в роли нейромедиатора. При введении ангиотензина II как в кровеносное русло, так и в желудочки головного мозга наблюдается повышение артериального давления. Кроме того, при центральном введении ангиотензин высвобождает вазопрессин и АКТГ, стимулирует потребление жидкости, нарушает обучаемость. На основании физиологических и фармакологических исследований эффектов ангиотензина II и распределения ангиотензиновых рецепторов в головном мозге можно предположить, что ангиотензин является медиатором. Его действие проявляется в лимбической системе. Кроме того, ангиотензиновые рецепторы расположены на лактотрофных и кортикотрофных клетках гипофиза и опосредуют действие ангиотензина II на секрецию пролактина и АКТГ. В отличие от ангиотензиновых рецепторов надпочечников и сосудов, число ангиотензиновых рецепторов передней доли гипофиза не зависит от солевого баланса или от инфузии ангиотензина II.

Данные о влиянии трёх различных видов вазопрессина, встречающихся в природе, на артериальное давление, диурез и изолированную матку крыс (dp–Tyr–Me–AVR и Tyr–Me–AVR подавляют действие вазопрессина на матку крыс, но не влияют на его антидиуретический эффект; только dp–Tyr–Me–AVR ингибирует гипертензивное действие вазопрессина) указывают на существование по крайней мере двух типов вазопрессиновых рецепторов.

Кинины. При изучении кининовых рецепторов также были выявлены два типа рецепторов: B_1, опосредующих сократительное действие брадикинина на аорту и брыжеечную вену кроликов, и B_2, опосредующих расслабляющее действие брадикинина на сонную артерию и шейную вену кроликов.

Таблица 6.1

Параметры связывания белково-пептидных гормонов с их рецепторами

Локализация рецепторов	K_a, M^{-1}	Константа скорости ассоциации, $c^{-1} \cdot M^{-1}$	Константа скорости диссоциации, c^{-1}	$B_{м\ max}$ (число участков на клетку)	Кооперативность связывания
Инсулиновые рецепторы					
Печень	$1{,}2 \cdot 10^8$	$(0{,}13–1) \cdot 10^{-3}$	$0{,}7 \cdot 10^{-3}$	100 000–250 000	Отрицательная
Гепатоциты изолированные	$K_{a1} = 2 \cdot 10^9$ $K_{a2} = 1{,}1 \cdot 10^9$	— —	— —	50 000 9100	— —
Адипоциты	$3{,}3 \cdot 10^8$	$4{,}1 \cdot 10^3$	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$	50 000	Отрицательная
Через 24 ч после удаления инсулина	—	—	—	$(10–12) \cdot 10^5$ $20 \cdot 10^5$	—
Моноциты	$1{,}3 \cdot 10^8$	—	—	16 000	Отрицательная
Эритроциты индюка	$3{,}2 \cdot 10^8$	—	—	3000	Отрицательная
Эритроциты лягушки	$K_{a1} = 5{,}8 \cdot 10^4$	—	—	425	—
Эритроциты свиньи	$8{,}2 \cdot 10^7$	—	—	29	—
Синаптосомы мозга	$3{,}3 \cdot 10^8$	—	—	80 *	—
Эмбриональная карцинома	$K_{a1} = 1{,}69 \cdot 10^{99}$	—	—	$0{,}112 \cdot 10^5$	—
Клетки панкреатических островков	$2{,}2 \cdot 10^9$	—	—	$0{,}58 \cdot 10^{-17}$ **	—
Мембраны плаценты	—	—	—	2,93–3,70 *	—
Плацента (после солюбилизации)	$K_{a1} = 3{,}3 \cdot 10^9$ $K_{a2} = 22 \cdot 10^9$	— —	— —	0,29 * 1,95 *	— —
Клетки асцитной опухоли Эрлиха	$(3–1) \cdot 10^7$	—	—	180 000	—
Плазматические мембраны щитовидной железы быка	$K_{a1} = 1{,}5 \cdot 10^9$ $K_{a2} = 5 \cdot 10^6$	— —	— —	— —	— —
Ядра клеток щитовидной железы быка	$K_{a1} = 0{,}08 \cdot 10^9$ $K_{a2} = 1{,}4 \cdot 10^6$	— —	— —	— —	— —

Таблица 6.1 (*окончание*)

Локализация рецепторов	K_a, M^{-1}	Константа скорости ассоциации, $c^{-1} \cdot M^{-1}$	Константа скорости диссоциации, c^{-1}	$B_{м\ max}$ (число участков на клетку)	Кооперативность связывания
Плазматические мембраны и ядра гепатоцитов мышей	$0{,}3 \cdot 10^9$	–	–	–	–
Глюкагоновые рецепторы					
Печень	$1{,}5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{-3}$	110000	–
Плазматические мембраны гепатоцитов	$2{,}5 \cdot 10^8$	–	–	–	–
Рецепторы СТГ					
Лимфоциты	$1{,}3 \cdot 10^9$			4000	Нет
Плазматические мембраны различных органов	$0{,}026–0{,}32 \cdot 10^9$	–	–	–	–
Мембраны комплекса Гольджи легких крыс	$1 \cdot 10^9$	–	–	–	–
Рецепторы ЛГ					
Клетки Лейдига	$0{,}5–1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-6}$	6 000	Нет
Рецепторы хорионического гонадотропина					
Яичник	$0{,}6 \cdot 10^{10}$	$2{,}8 \cdot 10^6$	$2{,}1 \cdot 10^{-5}$	–	–
Рецепторы ЛТГ					
Микросомы печени	$5{,}6 \cdot 10^9$		–	–	–
Гранулезные клетки	$1{,}5 \cdot 10^{10}$	–	–	–	–
Печень Печень (после солюбилизации)	$1{,}02–1{,}20 \cdot 10^9$	–	–	0,6–1,8 * 1,06–4,48 *	–
Гонадолиберриновые рецепторы					
Передняя доля гипофиза	$3 \cdot 10^9$	$13 \cdot 10^7$	0,015–0,018	–	–

Субстанция Р. Исследование действия другого вазодилататора — субстанции Р и её производных на сонную артерию собак, подвздошную кишку морской свинки и толстый кишечник крыс — дало возможность предположить существование трёх различных типов рецепторов для этих пептидов.

Нейротензины. Поскольку D-Trp^{11}- и Tyr-Me^{11}-нейротензин блокируют влияние нейротензина на портальную вену и сердце крыс, но не на желудок, можно считать, что существуют два типа нейротензиновых рецепторов.

Таким образом, проведение фармакологических экспериментов, в которых были определены такие параметры, как сродство и внутренняя активность вазоактивных пептидов, позволяет заключить, что для вазопрессина, кининов, нейротензина и субстанции Р существует несколько типов рецепторов. Необходимо отметить, что нейромедиаторную функцию может выполнять не только ангиотензин, но и другие белково-пептидные гормоны — кальцитонин, инсулин, вазоактивный полипептид кишечника, субстанция Р, холецистокинин.

У тиреотропин-рилизинг-фактора выявлена анальгетическая активность, которая была значительно выше при его введении в желудочки головного мозга, чем при внутрибрюшинном введении мышам. При этом максимальный анальгетический эффект указанного пептида выше, чем у морфина. Антагонисты норадреналиновых, дофаминовых, серотониновых рецепторов не влияют на его обезболивающее действие. Всё это даёт возможность предполагать, что сильная обезболивающая активность тиреотропин-рилизинг-фактора обусловлена его взаимодействием с ещё не изученными рецепторами ЦНС.

Заканчивая рассмотрение различных аспектов комплексообразования белково-пептидных гормонов с рецепторами, необходимо указать на специфичность этого комплексообразования. Обычно при изучении конкуренции между меченым гормоном и его аналогами за связывание с рецепторами имеет место корреляция между конкурирующей способностью соединений с их биологической активностью. Имеются данные об антагонистах белково-пептидных гормонов, которые специфично конкурируют с гормонами за связывание с рецепторами, но не вызывают физиологической реакции.

Гормоны с близкой биологической активностью могут связываться с одними и теми же рецепторами. Например, ЛГ и хорионический гонадотропин непосредственно взаимодействуют с одним и тем же рецептором в гонадах, а такие родственные гормоны, как секретин, глюкагон и вазоактивный пептид кишечника, имеют различные рецепторы. Для гормонов, у которых перекрываются спектры их физиологической активности, характерны более сложные взаимоотношения. СТГ, пролактин и плацентарный лактоген реализуют свои эффекты посредством по крайней мере двух рецепторных участков: одного более специфичного к СТГ, а другого более специфичного к лактогенным пептидам. Аналогично инсулин имеет некоторое сходство в своём действии на рост клеток и утилизацию глюкозы с ростковыми факторами и соматомединами. И в данном случае находят один класс рецепторов с высоким сродством к инсулину и с низким сродством к ростковым факторам и другой класс рецепторов с более высоким сродством к ростовым факторам, чем к инсулину. Эти данные указывают, что для того или иного типа белково-пептидных гормонов могут существовать различные классы рецепторов, идентифицируемые как с помощью радиолигандов, так и путём фармако-биохимического анализа. Несомненно, создание в будущем новых специфических антагонистов различных белково-пептидных гормонов будет способствовать выяснению их гетерогенности в отношении функциональной активности и сродства к лигандам.

6.3. Субклеточная локализация рецепторов белково-пептидных гормонов

Хорошо известно, что рецепторы белково-пептидных гормонов присутствуют на плазматических мембранах компетентных клеток. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов по связыванию меченых гормонов с интактными клетками, с очищенными плазматическими мембранами (при очистке концентрация рецепторов увеличивается в 30–100 раз) и по изучению биологической активности производных гормонов, ковалентно присоединённых к гранулам агарозы или сефарозы. Однако ряд исследователей выявили и присутствие участков, специфически связывающих белково-пептидные гормоны, на внутриклеточных органеллах-мембранах незернистой и зернистой эндоплазматической сети, комплекса Гольджи и ядра.

Соматотропин человека специфически связывается с фракциями плазматических мембран и мембран комплекса Гольджи печени крыс, причём мембраны комплекса Гольджи связывают гормон даже с бóльшим сродством, чем плазматические мембраны. Для СТГ также найдены рецепторы мембран комплекса Гольджи, которые отличаются от его рецепторов плазматических мембран.

О способности инсулина связываться с мембранами комплекса Гольджи также есть сообщения.

Через 12 мин после инъекции ^{125}I-инсулина в брыжеечную вену кролика большую часть метки обнаруживают внутри гепатоцитов, а при одновременной инъекции избытка немеченого инсулина метка внутри клетки не накапливается. Авторы считают, что введённый в воротную вену инсулин в течение 3 мин связывается с плазматическими мембранами гепатоцитов и через 3 мин интернализуется. По их мнению, в условиях *in vivo* интернализуется только связанный с мембранами инсулин.

Большой интерес представляет сравнение связывания белково-пептидных гормонов с плазматическими и ядерными мембранами компетентных клеток. ^{125}I-инсулин специфически и обратимо связывается с изолированными ядрами и плазматическими мембранами клеток щитовидной железы быка. Равновесие достигалось за 1 ч при связывании ^{125}I-инсулина с ядрами и за 2 ч при его связывании с плазматическими мембранами. По данным графиков Скэтчарда, на ядрах и плазматических мембранах присутствуют два класса связывающих центров с высоким ($K_д$ равна 1,3 и 0,6 нМ) и низким ($K_д$ равна 667 и 208 нМ) сродством соответственно. Диссоциация радиолиганда, связанного с рецептором на плазматических мембранах, но не на ядре, ускорялась в присутствии немеченого инсулина, что может указывать на отрицательную кооперативность связывания инсулина с плазматическими мембранами, но не с ядром.

Обнаружены три компонента с M_r = 120 000, 90 000 и 50 000 в плазматических и ядерных мембранах печени нормальных мышей и мышей с ожирением, связывающих ^{125}I-инсулин. Однако ядерные мембраны по сравнению с плазматическими содержали меньше белков, связывающих инсулин. В то же время сродство инсулина к рецепторам ядерных и плазматических мембран было одинаковым ($K_д \sim 3$ нМ).

После инкубации ядер с ^{125}I-инсулином связанный с ядрами инсулин присутствует в основном в мембранах ядра. Инсулин связывался также с очищенными ядерными мембранами. При этом в ядерных мембранах обнаружены два класса участков связывания (рецепторов) инсулина с низким и высоким сродством ($K_д$ равна 5,6 и 65 нМ соответственно). Эти рецепторы инсулина в ядерных мембранах имели более низкое сродство к инсулину, чем его рецепторы плазматических мембран. Суммарная инсулинсвязывающая способность ядерных и плазматических мембран одинакова (2 нмоль/мг белка). Аутоантитела против инсулина от больных с инсу-

линустойчивым диабетом угнетали связывание инсулина с ядерными мембранами, но в значительно меньшей степени, чем с плазматическими мембранами. В низких концентрациях (1 пМ) инсулин стимулировал выход мРНК из ядер в бесклеточной системе и вызывал увеличение активности связанной с ядерными мембранами нуклеозидтрифосфатазы.

Таким образом, можно считать, что инсулиновые рецепторы ядерных мембран наряду с его рецепторами плазматических мембран принимают участие в связывании гормона и в реализации его биологической активности.

В дополнение к этому можно указать на сообщения о ядерной локализации связывающих участков для ТТГ в фолликулярных клетках щитовидной железы, митохондриальной локализации связывающих участков для парат-гормона в эпителии почечного канальца, цитоплазматической и ядерной локализации связывающих участков для гонадотропинов в семенниках, ядерной локализации участков связывания для рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона гипофиза крыс [1, 2].

Применение методов иммунофлюоресценции, авторадиографии и электронно-плотных меток позволило установить, что рецепторы белково-пептидных гормонов на плазматических мембранах расположены не гомогенно, а образуют кластеры по 3–12 молекул рецепторов, ассоциированных с гликокаликсом. Более детальное изучение процессов кластеризации показало, что в большинстве случаев комплексы гормон–рецептор кластеризуются в специализированных областях плазматической мембраны — так называемых покрытых, или окаймлённых, ямках. Оказалось, что покрытые клатрином (белком, фиксирующим рецепторы) окаймлённые ямки являются стабильными элементами; они постоянно связаны с плазматическими мембранами и лишь претерпевают морфологические изменения в процессе эндоцитоза и пиноцитоза. После связывания и кластерирования лигандов в покрытые окаймлённые ямки начинается температурный и, вероятно, энергозависимый процесс закрытия шейки этой ямки. Существенно, что слияния мембран в области шейки на этой стадии не происходит; в данном случае имеет место «скрытая форма окаймлённых ямок», которая характеризуется функциональной изоляцией. Следующая стадия — образование рецептосом, или эндосом. Считается, что при закрытии шейки активный транспорт ионов может вызывать повышение гидростатического давления внутри окаймлённой ямки, которое заставляет её удлиняться. В последующем рецептосома отрывается от окаймлённой ямки и направляется либо в комплекс Гольджи, либо сливается с лизосомами. Вторичные лизосомы, образующиеся в результате этого слияния, содержат внутри мембраны, рецептор и ферменты родительских первичных лизосом. В такой системе гормон может претерпевать инактивацию и частичную деградацию (то же, по-видимому, относится и к рецептору) в автофагоцитирующей лизосоме. Вместе с тем гормон может претерпевать только частичную деградацию в функционально модифицированной лизосоме, называемой регуляторной. Затем гормон и его биологически активный фрагмент высвобождается из лизосомы и может теперь взаимодействовать с различными компонентами цитоплазмы или с ядром. Описанное явление получило название «интернализация». Этот термин уже применялся нами ранее. Другими словами, гормон может проникать в клетку и связываться с внутриклеточными рецепторами.

С помощью фотореакционноспособного инсулина и метода авторадиографии были получены данные об интернализации инсулин-рецепторного комплекса. Ведение крысам глюкозы (300 мг) вызывает 5-кратное увеличение уровня инсулина в плазме и последующее уменьшение его связывания с плазматическими мембранами печени на 20–25 %, но повышение его связывания с мембранами комплекса Гольджи на 50–70 %. Эти изменения были максимальны через 5–15 мин и полностью исчезали через 1 ч. Они были обусловлены увеличением числа инсулиновых рецепторов во

фракции комплекса Гольджи и снижением их числа в плазматических мембранах. Авторы заключают, что повышение концентрации инсулина в крови приводит к быстрой и обратимой транслокации инсулиновых рецепторов с поверхности клетки внутрь гепатоцитов без изменения их общего числа.

Заметим, что концепция о захватывании пептидных гормонов, связанных со специфическими рецепторами, системой «покрытые углубления — лизосомы» не является полностью оригинальной. Во многих классических исследованиях показано, что эта система важна для транспорта питательных и чужеродных веществ внутрь различных клеток. Таким образом, экспериментальное доказательство возможности проникновения белково-пептидных гормонов внутрь клеток и демонстрация локализации их рецепторов не только на плазматической мембране, но и на внутриклеточных органеллах заставляют пересмотреть ранее принятую схему действия белково-пептидных гормонов, согласно которой они не проникают в клетку, а взаимодействуют только с рецепторами на плазматической мембране клетки-мишени. Эту схему можно теперь дополнить этапом проникновения белково-пептидных гормонов внутрь клетки и взаимодействием их с внутриклеточными рецепторами ядра, лизосом, комплекса Гольджи и других органелл.

6.4. Химическая природа рецепторов белково-пептидных гормонов

Применение комплекса физико-химических методов, таких как фотоаффинные и радиоактивные метки, радиоактивная инактивация, электрофорез, различные хроматографические и иммунологические методики, а также использование детергентов позволили достигнуть значительного прогресса в выделении, очистке и определении химической природы рецепторов белково-пептидных гормонов.

Во всех экспериментах по идентификации гормональных рецепторов обнаруживают деградирующее действие на них протеолитических ферментов, что указывает на важнейшую роль белковой компоненты рецепторов в узнавании гормона Вместе с тем влияние фосфолипазы на связывание АКТГ, тиреотропин-рилизинг-фактора, ЛГ, инсулина и других гормонов свидетельствует о существенной роли фосфолипидов в процессах рецепции этих гормонов. Для рецепторов инсулина, ТТГ, гонадотропинов характерно участие углеводов в связывании гормонов.

У рецепторов гонадотропинов дисульфидная группа расположена в самом активном центре или вблизи него; об этом свидетельствует чувствительность рецепторов к обработке *n*-хлорбензоатом ртути и N-этилмалеимидом.

Молекулярная масса солюбилизированных рецепторов белково-пептидных гормонов в отсутствии детергентов находится чаще всего в области от 30 000 до 350 000.

Рецепторы инсулина, ТТГ и ЛГ представляют собой гликопротеины, а пролактина, лактогенного гормона, ангиотензина II и рилизинг-фактора гонадотропина — белки, глюкагона — липопротеин.

Нередко в солюбилизированном материале рецепторов белково-пептидных гормонов присутствует аденилатциклазная активность, что указывает на тесную ассоциацию этого фермента с рецепторами. Центрифугирование в градиенте плотности солюбилизированных рецепторов позволяет определить их коэффициент седиментации и радиус Стокса: 5–12 S и 4–8 нм соответственно.

Рецепторы белково-пептидных гормонов являются интегральными мембранными белками. Они обычно связывают при солюбилизации большое количество тритона X-100 или другого неионного детергента (0,2–1,4 мг/мг белка). Как правило, эти рецепторы имеют большой объём и характеризуются неравномерной гидратацией.

При солюбилизации рецепторов для ЛГ и хорионического гонадотропина, любролом РХ выявляются два пика связывания гормона, меченного ^{125}I. Первый пик имеет кажущуюся молекулярную массу около 200 000 (белок, дающий первый пик, ассоциирован с аденилатциклазной системы). С помощью аффинной хроматографии очищен гонадотропиновый рецептор до уровня 2500 пмоль/мг белка. Этот очищенный рецептор сохраняет высокую способность специфично связывать гонадотропины (при гель-электрофорезе с додецилсульфатом натрия рецептор характеризуется одним компонентом с молекулярной массой 90 000).

С помощью аффинной хроматографии на инсулин-сефарозе очищен солюбилизированный тритоном Х-100 рецептор инсулина из плаценты человека. Выход белка составил 200–300 мкг из одной плаценты (300 г влажной массы). В растворе инсулиновый рецептор существовал в виде комплекса с $M_r = 440\,000$, состоящего из кислого олигомерного белка 350 000 и связанного с этим белком детергента.

По данным центрифугирования в градиенте сахарозы рецепторный белок асимметричен ($f/f_0 = 1{,}4$), имеет коэффициент седиментации 12 S, связывает 140 моль тритона Х-100 на 1 молекулу рецептора. При электрофорезе меченного ^{125}I рецептора в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия были обнаружены неокрашиваемые реактивом Кумасси пептиды с массой 45 000 и 90 000 и окрашиваемый реактивом Кумасси пептид с массой 135 000. Поскольку только последний пептид был специфически помечен ^{125}I-инсулином, можно считать, что именно он представляет центр связывания инсулина.

В плазматических мембранах клеток печени, почек, лёгких крыс и плаценте человека обнаружены одни и те же субъединицы инсулинового рецептора с $M_r = 350\,000$, 320 000, 290 000. При восстановлении S–S-связей каждый из рецепторов диссоциировал в два этапа. На первом этапе при низкой концентрации дитиотрейтола структура 350 000 диссоциирует до 210 000, а структура 290 000 — до 160 000. Структура 310 000 диссоциирует на две молекулы — 210 000 и 160 000. При высокой концентрации дитиотрейтола структура 350 000 диссоциирует до субъединиц 125 000 (α) и 90 000 (β), структура 290 000 образует α-субъединицы и субъединицы 49 000 (β_1). При полном восстановлении структуры 320 000 обнаружены все три типа субъединиц. Частично восстановленный фрагмент 210 000 состоял из α-субъединицы, связанной дисульфидной связью с β-субъединицей, а фрагмент 160 000 из α-субъединиц, связанной с β_1-субъединицей. Таким образом, можно заключить, что во всех тканях одновременно присутствуют три различные молекулярные формы рецепторов инсулина — $(\alpha)_2$-$(\beta)_2$ (350 000), $(\alpha)_2$-(β)-(β_1) (320 000) и $(\alpha)_2$-$(\beta_1)_2$ (290 000).

Гетеротетрамерную структуру рецептора инсулина можно представить формулой (β-S–S-α)–S–S–(β-S–S-α), где α- и β-субъединицы имеют соответственно 125 и 90 кД, причём S–S-связь между (α-S–S-β)-частями обладает более высокой чувствительностью к экзогенным восстановителям.

При изучении инсулиновых рецепторов адипоцитов крысы методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей авторадиографией выявлено, что фотоаффинное производное инсулина N-азидобензоилинсулин, меченный ^{125}I, модифицирует три полипептида плазматических мембран с $M_r = 130$, 90 000, 40 000. В отсутствии соединений, восстанавливающих дисульфидные связи, радиоактивная метка обнаружена в белках с $M_r = 300\,000$. Восстановление этих комплексов приводило к появлению полос, соответствующих $M_r = 130\,000$, 90 000 и 40 000. Модификация этих белков не зависела от времени или от температуры инкубации, а также от присутствия ингибиторов протеолиза: метиламина, хлорохина, бацитрацина, фенилметилсульфонилфторида, *n*-хлорбензоата ртути, транэилола, N-метилмалеимида или бензамидина. Протеолиз в полиакриламидном геле трипсином и химотрипсином компонентов 130 000 и 90 000 не приводил к появлению полосы, соответствующей

$M_r = 40\,000$. Все субъединицы защищались от модификации избытков инсулина и преинкубацией с сывороткой крови больных, содержащих аутоиммунные антитела против рецепторов инсулина.

С помощью фотоаффинной метки в плазматических мембранах гепатоцитов выявлены инсулиновые рецепторы с молекулярной массой 130 000 и 117 000, а в мембранах адипоцитов — только с молекулярной массой 130 000. Две формы инсулиновых рецепторов печени, отличающихся между собой структурой субъединиц, могут быть ответственны за различные функции: одна из них участвует в поглощении инсулина, а другая — в реализации его действия.

На поверхности адипоцитов мышей 3T3-LP существуют латентные рецепторы инсулина, которые солюбилизируются 1%-м тритоном X-100. Среди солюбилизированных белков были идентифицированы два полипептида, связывающих инсулин, один из которых с $M_r = 130\,000$ был идентичен гормонсвязывающей субъединице рецептора. Второй полипептид, как полагают авторы, относится к популяции «латентных» рецепторов, так как не подвергается изменениям в результате ферментативного гидролиза, приводящего к снижению инсулина с рецепторами клеточной поверхности на 90%. Эксперименты по схеме «импульс-чейз» позволили предположить, что полипептид с $M_r = 180\,000$ является предшественником, подвергающимся процессингу с образованием субъединиц рецептора инсулина.

Согласно современным представлениям инсулиновый рецептор представляет собой гликопротеин, состоящий из двух α-субъединиц с молекулярной массой 135 кДа, каждая из которых содержит 719 или 731 аминокислотных остатков, и двух β-субъединиц с молекулярной массой 95 кДа (620 аминокислотных остатков, субъединицы образуют между собой дисульфидные связи, формируя гетеротетрамер β-α-α-β. α-Субъединицы в основном расположены внеклеточно и содержат участки, связывающие инсулин, а β-субъедицины находятся внутри мембраны и обладают тирозинкиназной активностью.

Рецепторы к другим белково-пептидным гормонам также имеют олигомерную структуру. Радиоактивно и фотоаффинно меченый глюкагон включается в один белок мембран печени крыс с $M_r = 200\,000$ и в два белка с M_r в диапазоне 52 000–70 000. Для радиоактивности в этом диапазоне молекулярная масса различалась в восстановленных и невосстановленных образцах, что указывает, так же как и в случае инсулиновых рецепторов, на наличие внутримолекулярных дисульфидных связей. M_r фотоаффинно меченого рецептора глюкагона, солюбилизированного Лубролом-ПХ, по данным гель-фильтрации на ультрагеле AcA22, составляет 200 000–250 000. Добавление ГТФ к солюбилизированному их необлучённых мембран комплексу ^{125}I-2(2-нитро-4-азидофенил)-сульфинилтриптофан-^{125}I-глюкагона с рецептором приводило к его полной диссоциации. В частично очищенной гель-фильтрацией фракции содержались все включающие радиоактивность пептиды. Следовательно, можно считать, что рецептор глюкагона является олигомерным белком, состоящим не менее чем из двух субъединиц, соединённых и/или стабилизированных дисульфидными связями. В печени кролика субъединица рецептора для СТГ имеет молекулярную массу 57 000; рецептор может существовать в виде димера (100 000–124 000) или более крупного олигомера (300 000). В отношении рецепторов белково-пептидных гормонов, находящихся на мембранах клеток щитовидной железы свиньи, можно отметить, что они находятся в двух формах: с высоким и низким сродством к тиреотропину.

Таким образом, можно заключить, что рецепторы белково-пептидных гормонов представляют собой олигомерные белковые комплексы. В их структуру могут входить углеводы и другие низкомолекулярные соединения, которые как интегральные мембранные белки тесно ассоциированы с фосфолипидами. Поскольку связывающая способность этих рецепторов чувствительна или к блокаторам SH-групп, входящих

в состав связывающих участков, или к восстановителям дисульфидных связей, определяющих степень диссоциации рецепторных субъединиц, можно ожидать, что от состояния окисления сульфгидрильных групп будет сильно зависеть функциональная активность этих рецепторов.

6.5. Молекулярные механизмы функционирования рецепторов белково-пептидных гормонов

Современные представления о функционировании рецепторов белково-пептидных гормонов основаны на жидкостно-мозаичной модели плазматических мембран, которая в настоящее время является общепринятой. Поскольку многими авторами была выявлена зависимость активации гормонами биомолекул-эффекторов (например, аденилатциклазы) от вязкости мембран, была предложена теория подвижных рецепторов, способных латерально диффундировать в плоскости мембраны, согласно которой гормональный рецептор (R) и эффектор (E) как интегральные белки могут свободно «плавать» в мембране. При активации гормонами (H) рецептора происходит изменение его конформации, в результате чего у него появляется возможность взаимодействовать с эффекторами. Последовательность этих событий можно написать в виде уравнений:

$$H + R = HR \quad \text{(на поверхности мембраны)},$$

$$HR + E = HR\text{–}E \quad \text{(внутри мембраны)}.$$

Таким образом, получается, что разные гормоны взаимодействуя с разными рецепторами, могут активировать один и тот же эффектор, но и каждый гормон может влиять на функцию более чем одного эффектора.

Убедительным доказательством данной теории явились эксперименты по гибридизации мутантных клеток, не имеющих рецепторов, с нормальными клетками, у которых предварительно инактивировали аденилатциклазу. Непосредственного контакта рецепторов и эффекторов при этом не устанавливается, так как гормонально стимулируемая аденилатциклазная активность восстанавливается значительно быстрее, чем происходит диффузное смешение мембранных белков.

При этом оказалось, что существуют мутантные клетки (лимфома S49), имеющие нормальные рецепторы и эффекторы, но не способные к сопряжению.

Впоследствии было обнаружено, что таким сопрягающим фактором является ГТФ-связывающий или регулируемый нуклеотидами белок (обозначаемый G или N). При этом было установлено, что существуют два типа этих регуляторных компонентов: G_s и G_i, опосредующих способность ГТФ стимулировать и ингибировать аденилатциклазу соответственно. Следовательно, для реализации физиологической активности гормонов необходимо присутствие как самого гормона, так и ГТФ. Тогда описание взаимодействия гормона с компонентами эффекторной системы будет выглядеть следующим образом:

$$H + RN = H{\cdot}R{\cdot}N^*$$

$$H{\cdot}R{\cdot}N^* + \text{ГТФ} = H{\cdot}R{\cdot}N{\cdot}\text{ГТФ} = H + R{\cdot}N{\cdot}\text{ГТФ}$$

$$H{\cdot}R{\cdot}N{\cdot}\text{ГТФ} + E = \underset{\displaystyle \underset{\displaystyle \text{ГТФ}}{|}}{H{\cdot}R{\cdot}N{\cdot}E}$$

(Активный голофермент)

На I этапе образуется активированное состояние N*, что позволяет на II этапе образовать комплекс H·R·N·ГТФ, способный на II этапе активировать фермент. При этом присоединение ГТФ приводит к уменьшению сродства R к H (этап II) и прекращению его сопряжения с E. Таким образом, ассоциация макромолекулярных компонентов (R·N·E) увеличивает связывание лигандов (гормона и ГТФ). В этой «несопряжённой» равновесной модели конечная концентрация активного голофермента есть функция относительных концентраций как макромолекулярных компонентов, так и лигандов. В состоянии равновесия все комплексы R·N обладают одинаковой способностью взаимодействовать с E, но количество RNE лимитируется концентрацией E. В печени E составляет 4–10% от уровня R и N. Мембраны клеток с генетически детерминированным дефицитом N_s не чувствительны к гормонам и гуаниновым нуклеотидам, а добавление к ним экстрактов, содержащих N_s, восстанавливает способность ГТФ влиять на связывание гормонов.

Чаще всего белково-пептидные гормоны стимулируют аденилатциклазную систему, однако инсулин, ангиотензин II и соматостатин её ингибируют.

Для большинства рецепторов белково-пептидных гормонов характерно их сопряжение с аденилатциклазой. Поэтому многими авторами признаётся универсальной медиирующая роль этого фермента в процессе реализации биологической активности гормонов.

Важно подчеркнуть, что большинство эффектов белково-пептидных гормонов, осуществляющихся за счёт прироста цАМФ, реализуются лишь в присутствии Ca^{2+}. Согласно современным представлениям, гормоны вызывают повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} посредством двух механизмов: усиленного притока из внеклеточного пространства (по-видимому, этот процесс связан с изменением обмена фосфотидилинозитола) и высвобождением Ca^{2+} в цитозоль из связанного состояния в митохондриях (результат действия цАМФ-зависимых протеинкиназ).

Осуществление внутриклеточных эффектов Ca^{2+} тесно взаимосвязано с функционированием специфического Ca^{2+}-связывающего белка кальмодулина, одной из функций которого является активирование фосфодиэстеразы, расщепляющей цАМФ. Возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} также сопровождается увеличением внутриклеточного содержания цГМФ. В свою очередь, цГМФ тормозит поступление Ca^{2+} в клетку. Ионы Ca^{2+} активируют фосфолипазу А, что приводит к индукции образования простагландинов.

Естественно, последовательность биохимических событий, возникающая в той или иной клетке после её взаимодействия с соответствующим гормоном, в каждом случае имеет свои особенности. Мы же привели лишь наиболее характерные изменения метаболизма компетентных клеток, вызываемые различными белково-пептидными гормонами, чьи рецепторы сопряжены с аденилатциклазой.

Отметим, что многие рецепторы для биогенных аминов и других биологически активных веществ также сопряжены с аденилатциклазой. При этом чувствительность данного сопряжения с аденилатциклазой как для тех, так и для других рецепторов к различным воздействиям (гуаниновые нуклеотиды, катионы, фосфолипазы) часто одинакова. Поэтому мы не считаем целесообразным механизмы данного сопряжения рассматривать для каждого отдельного гормона, а ограничимся тремя общими схемами, на которых представлены два класса рецепторов, передающих стимулирующее или ингибирующее действие гормонов на аденилатциклазу посредством нуклеотидсвязывающих регуляторных белков.

В то же время мы не можем утверждать, что эта схема абсолютно универсальна. Аденилатциклаза является не единственной эффекторной системой, сопряжённой с рецепторами белково-пептидных гормонов. Анализ белков гипофиза, фосфорилируемых при воздействии тиролиберина или в результате повышения внутриклеточного

уровня цАМФ, вызываемого B_{r2}-цАМФ или 8-Br-цАМФ, позволяет заключить, что тиролиберин действует по независимому от цАМФ пути. Соматостатин стимулирует фосфопротеинфосфатазу в цитозоле клеток слизистой оболочки желудка крыс и фосфопротеинфосфатазу, очищенную в 40 раз методом хроматографии на сефарозе. Авторы считают, что в клетках слизистой оболочки желудка, как и в клетках других органов желудочно-кишечного тракта, присутствуют внутриклеточные рецепторы соматостатина, которые являются регуляторной субъединицей фосфопротеидфосфатазы. Дефосфорилирование фосфопротеидов может быть одним из механизмов действия соматостатина.

АКТГ, но не стабильный аналог цАМФ вызывает увеличение включения ^{3}H-лейцина в белок надпочечников линии Y_1. В экспериментах *in vivo* цАМФ, вводимый гопофизэктомированным крысам, вызывал увеличение концентрации кортикостерона в крови 2 до 270 нг/мл, не влияя на уровень биосинтеза белка в надпочечниках. Циклогексамид полностью блокировал увеличение биосинтеза белка и лишь на 30% уменьшал биосинтез кортикостероидов, индуцируемых АКТГ. Однако фрагмент $АКТГ_{11-24}$, не обладающий способностью активировать аденилатциклазу и стероидогенез, также замедлял деградацию белков. АКТГ, но не его фрагменты 1–10 и 11–24, α-меланотропин и ангиотензин II, индуцировал биосинтез цитоплазматического белка с $M_r = 30000$ и митохондриального белка с $M_r = 134000$ *in vivo*. Эти результаты дают возможность полагать, что АКТГ индуцирует стероидогенез посредством взаимодействия с рецепторами, сопряжёнными с аденилатциклазой, а трофическое и митогенное действие гормона осуществляется независимым путём — взаимодействием участка 1–10 АКТГ с ещё не изученными рецепторами.

Инсулин и адреналин ингибируют аденилатциклазу интактных гепатоцитов посредством индукции синтеза ингибирующего фактора с $M_r = 500$, присутствующего в низкомолекулярной цитозольной фракции и в белковой фракции, ассоциированной с плазматическими мембранами. Синтез этого фактора стимулировался сразу при добавлении инсулина или адреналина, достигая максимума через 3–5 мин, и возвращался к первоначальному уровню через 15–20 мин. Ингибирование этим фактором аденилатциклазы может происходить в результате фосфорилирования аденилатциклазы специфической протеинкиназой, стимулируемой данным фактором. Однако, как инсулин индуцирует синтез этого ингибирующего фактора, остаётся неизвестным. Возможно, что эта индукция обусловлена проникновением инсулина внутрь клеток и взаимодействием его с ядерными рецепторами.

С помощью перфузии сердца крысы можно изучать регуляцию инсулином активности гликогенсинтетазы. Обнаружено, что истощение фонда гликогена после перфузии сердца раствором без глюкозы приводит к 13-кратной активации гликогенсинтетазы и троекратному усилению её стимуляции инсулином. Эти эффекты коррелировали с изменением активности фосфорилазы, киназы фосфорилазы и внутриклеточного уровня цАМФ. Стимуляция этого фермента инсулином проявилась через 90 с после добавления инсулина в перфузионный раствор и достигала максимума на 4-й минуте. Зависимую от инсулина активацию гликогенсинтетазы обращали глюкагон и адренергические агонисты: адреналин, изопротеренол, фенилэфрин. Действие глюкагона и агонистов β-адренорецепторов осуществлялось через системы цАМФ, а агонистов α-адренорецепторов, вероятно, через систему транспорта Ca^{2+}. В связи с этим авторы заключают, что действие инсулина не опосредовано ни цАМФ, ни Ca^{2+}.

Инсулин стимулирует фосфорилирование очищенного рецептора, увеличивая включение метки в субъединицу 95000. Полумаксимальный и максимальный эффект инсулин вызывал в концентрациях 1 и 10 нМ соответственно. При инкубации фосфорилированного рецептора в среде, содержащей NaF, происходило его дефосфорили-

рование. Следовательно, эти результаты позволяют считать, что рецептор инсулина обладает протеинкиназой и фосфопротеинфосфатазной активностями.

Одна из частей инсулинового рецептора является протеинкиназой. β-Субъединицы инсулиновых рецепторов гепатоцитов крыс с $M_r = 95\,000$ представляют собой протеинкиназу и субстрат фосфорилирования. Предполагается, что инсулин связывается с α-субъединицей рецептора и тем самым вызывает конформационные изменения, отражающиеся на β-субъединицах в виде усиления их протеинкиназной активности. При этом происходит фосфорилирование молекулы инсулинового рецептора и других белков. Это фосфорилирование может быть инициатором каскада реакций, проявляющихся в виде различных эффектов инсулина. Кроме инсулина, способностью стимулировать киназную активность очищенного инсулинового рецептора обладают конканавалин А, агглютинин зёрен пшеницы и поликлональные антитела против инсулиновых рецепторов. В то же время моноклональные антитела против инсулиновых рецепторов, представляющие собой антагонисты инсулина, не стимулировали фосфорилирования инсулинового рецептора и подавляли стимулирующий эффект инсулина.

При повышении температуры с 16 до 37 °С снижается сродство инсулина к его рецепторам, но не их число. Способность инсулина стимулировать транспорт глюкозы повышалась с увеличением температуры. Эти данные дают возможность предполагать, что в связывании инсулина и в сопряжении инсулиновых рецепторов с транспортной системой для глюкозы принимают участие различные физико-химические процессы.

Наибольшее число исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов функционирования рецепторных систем белково-пептидных гормонов, посвящено инсулиновым рецепторам. Эти рецепторы являются одной из самых сложных молекулярных систем. Они представляют огромный практический интерес. Несомненный интерес имеют также сведения ещё об одном направлении исследований, которое может в дальнейшем помочь раскрыть полную картину реализации молекулярных механизмов действия инсулина на клетки-мишени. Речь идёт о протеазной активности инсулина. Существование у гормона данной активности подтверждается тем, что трипсин воспроизводит действие инсулина, выражающееся в активации пируватдегидрогеназы и гликогенсинтетазы в плазматических мембранах адипоцитов крыс и в стимуляции включения ^{14}С-глюкозы в гликоген гепатоцитов крыс. Эти эффекты инсулина подавляются ингибиторами протеаз. Выделен растворимый фактор, медиирующий влияние инсулина на активность пируватдегидрогеназы и гликогенсинтетазы. Он имел молекулярную массу, равную 3000, и был отрицательно заряжен при pH 7,4. Можно полагать, что данный фактор появляется в результате связывания инсулина с рецепторами и последующей активации протеаз, высвобождающих его из состава неизвестных белковых молекул.

В то же время подавление инсулином протеолиза внутриклеточных белков не чувствительно к ингибиторам протеаз. Блокирование протеолиза внутриклеточных белков, наблюдаемое только через 30 мин инкубации гепатоцитов с инсулином, устранялось ингибитором трансглутаминазы дансилкадаверином, который тоже подавляет накопление интернализованного ^{125}I-инсулина в клетках в присутствии ингибитора лизосомного протеолиза хлорохина. Поэтому следует полагать, что стимуляция инсулином включения глюкозы в гликоген и ингибирование протеолиза белков осуществляются разными путями. Видимо, для ингибирования протеолиза необходима интернализация инсулина, комплексированного с рецептором.

В последние годы большое внимание уделяется способности инсулиновых рецепторов регулировать радикальные процессы в клетке, так как установлена взаимо-

связь между активацией инсулинового рецептора и активностью НАД(Ф)Н-оксидазы [3–32] (рис. 6.1)

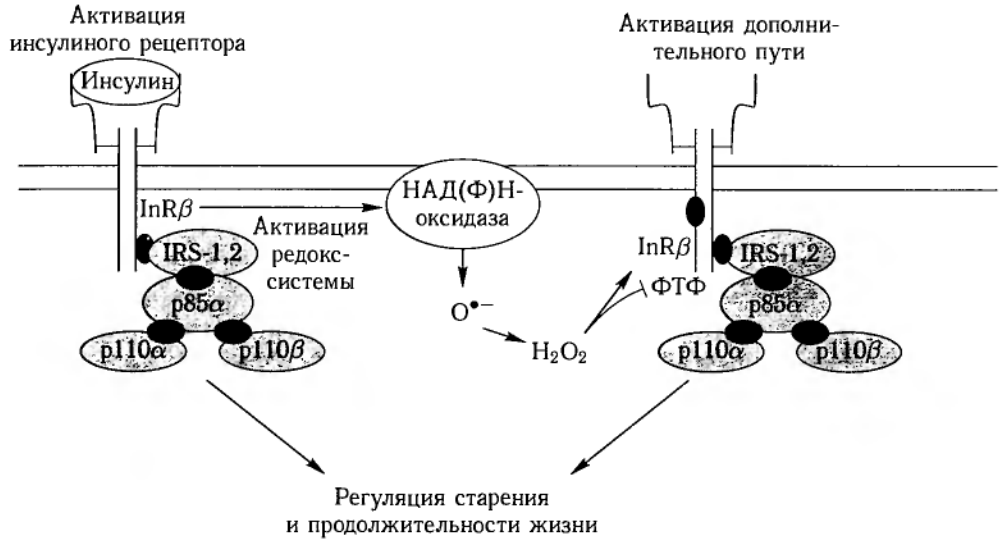


Рис. 6.1. Взаимодействие инсулинового рецептора (InR) с сигнальными путями редокс-системы. Стимуляция инсулинового рецептора сопровождается активацией каскада реакций, запускаемого тирозинкиназой. Это приводит к фосфорилированию тирозинового остатка рецептора и белков с сигнальными функциями (ФТФ), а также к образованию радикалов кислорода. Уровень фосфорилирования белков регулируется фосфатазами (ФТФ), ферментами, являющимися мишенью действия реакционноспособных метаболитов кислорода [31]

Повышение уровня радикалов кислорода увеличивает активность субъединиц инсулинового рецептора (InRβ), так как оптимальный инсулиновый ответ сопряжён с восстановлением β-субъединицы. В норме инсулин вызывает небольшое повышение уровня эндогенной H_2O_2. Это регулирует уровень фосфорилирования инсулинового рецептора и сигнальных белков вследствие обратимого оксилительного ингибирвоания фосфатазы, которое необходимо для реализации сигнальных путей инсулина (InRS) с участием сигнальных белков (p85, p110). Такая регуляция — это обычный физиологический процесс (рис. 6.2).

Полагают, что взаимоотношения между инсулиновой рецепцией и системой образования радикалов кислорода определяет устойчивость организмов к окислительному стрессу и продолжительность жизни, так как мыши с генетически сниженной активностью сигнального пути инсулинового рецептора имеют бóльшую продолжительность жизни.

По нашему мнению, современный период накопления пока ещё разрозненных и не всегда понятых фактов реализации внутриклеточных эффектов инсулина и других белково-пептидных гормонов в недалёком будущем закончится созданием обобщающей схемы преобразования рецепторами гормонального сигнала на различных уровнях клетки с учётом временнóй зависимости появления того или иного эффекта.

Новые данные о механизмах действия белково-пептидных гормонов указывают на комплексное, одновременное их действие как на плазматические мембраны клетки-мишени, так и на их органеллы, включая ядро. Именно это, по нашему мнению, и обусловливает многогранность, разнонаправленность, продолжительность и глубину их эффектов. Несомненно, что в будущем пристальное внимание исследователей

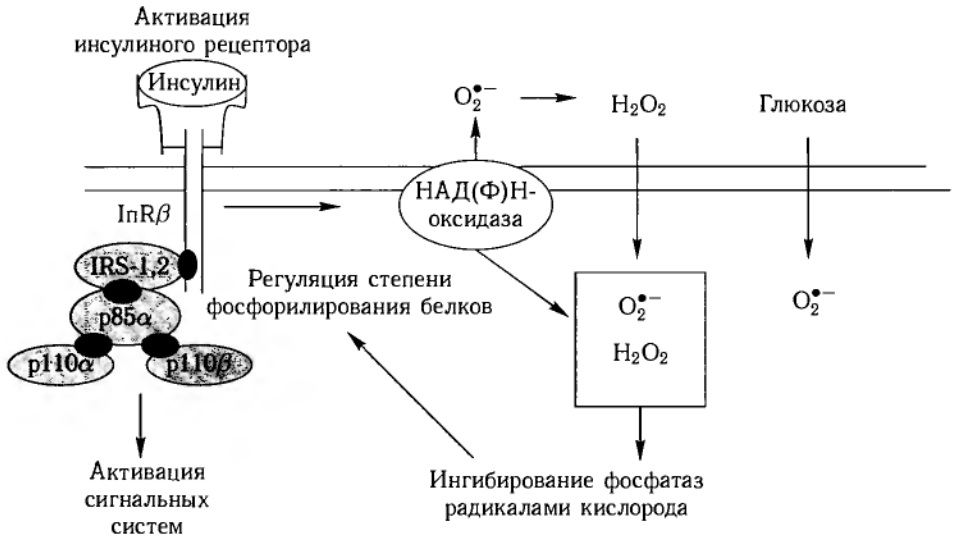


Рис. 6.2. Путь образования реакционноспособных радикалов кислорода при участии инсулинового рецептора. Образование реакционноспособных радикалов кислорода (супероксидный радикал или H_2O_2), вызываемое инсулином, сопряжено с системой НАД(Ф)Н-оксидазы. Супероксидный радикал, образующийся при участии НАД(Ф)Н-оксидазы, превращается в H_2O_2, которая регулирует каталитическую активность тиолзависимых белков — фосфатаз. Образование реакционноспособных радикалов кислорода, вызываемое инсулином, может усиливаться высокими концентрациями глюкозы, что приводит к увеличению продукции супероксидных радикалов в митохондриях и может также активировать НДФР-оксидазную систему [31]

будет направлено на выяснение природы внутриклеточных компонентов, воспринимающих гормональный сигнал комплексов гормон–рецептор или отдельного гормона после его отсоединения от рецептора и входа в клетку.

Тем не менее, нельзя забывать, что плазматическая мембрана является первой структурой, с которой связывается гормональная молекула. От этого взаимодействия во многом зависит весь ход дальнейших событий преобразования гормонального сигнала в биологический ответ клетки.

В нашей лаборатории с помощью флуоресцентных методов было показано, что процессы, которые сопровождают гормон-рецепторное взаимодействие, приводят к определённым структурным перестройкам мембран. При сравнении влияния инсулина и АКТГ на характер свечения флуоресцентных зондов $АНС^-$ и $НФН_2$ в плазматических мембранах клеток печени и искусственных фосфолипидных везикулах было обнаружено, что взаимодействие гормонов с плазматическими мембранами сопровождается изменением также и липидного слоя мембран. Причём, по-видимому, конформационные перестройки рецептороного белка являются первичными, обусловливающими специфику последующих изменений липидов [2]. Поскольку между регистрируемыми флуоресцентными характеристиками и изменением степени активности мембраносвязанных ферментов (АТФазы, 5′-нуклеотидазы) под воздействием гормонов имеется корреляция, можно предположить, что конформационные изменения и есть тот механизм, с помощью которого гормоны воздействуют на характер функционирования ферментных и транспортных систем мембраны.

В дальнейшем было установлено, что эффекты, вызываемые белково-пептидными гормонами на уровне плазматической мембраны, развиваются значительно быстрее, чем опосредуемые ядерным аппаратом. По-видимому, усиление транспорта амино-

кислот и других метаболитов («строительных материалов»), осуществляемого плазматической мембраной, должно предшествовать началу синтеза белков или других макромолекул по «проектам», хранящимся в геноме. Так ли это, покажут будущие эксперименты, однако нам представляется, что во временной последовательности данных эффектов ряда пептидных гормонов заложен приведённый выше биологический смысл. Заканчивая этот раздел, отметим, что по характеру трансдуктора и эффектора рецепторы белково-пептидных гормонов, локализованных в плазматических мембранах, можно разделить на следующие группы.

1. Трансдуктор — G-белок, который передаёт регулирующее влияние на аденилатциклазу или фосфолипазу С (лиганды этих рецепторов — пептиды, нейропептиды, цитокины, которые включают такие вещества, как вазопрессин, ангиотензин, холецистокинин, ФСГ, АКТГ и др.).

2. Эффекторная часть самого тетрамерного рецептора обладает каталитической активностью (тирозинкиназной, серин-треонинкиназной, гуанилатциклазной и фосфотирозинфосфатазной). Активация этих рецепторов приводит к фосфорилированию или дефосфорилированию белков или к образованию цГМФ.

К семейству лигандов рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью относятся эпидермальный фактор роста и его аналоги, инсулин. К семейству лигандов рецепторов, обладающих гуанилатциклазной активностью, относятся предсердные натрийуретические пептиды типов А, В, С. К семейству лигандов рецепторов, обладающих серин/треонинкиназной активностью, относятся Активин, Ингибин, трансформирующий фактор роста β типа I и II. К семейству лигандов рецепторов, имеющих множественное мультисубъединичное строение (эти рецепторы лишены собственной тирозинкиназной активностью, но сопряжены с цитоплазматической тирозинкиназой или другими киназами), относятся гормон роста, пролактин, эритропоэтин, интерлейкины (2–7), фактор некроза опухолей, онкостатин, интерфероны и др.

6.6. Регуляция обмена рецепторов белково-пептидных гормонов

Рецепторы гормонов, как и мембранные клетки, подвергаются непрерывному обмену: вновь синтезированные белки встраиваются в мембрану, а функционально «отработанные» деградируют. Естественно, любые изменения в скорости синтеза и деградации рецепторов будут приводить к изменению их общего количества.

В настоящее время мы уже располагаем некоторыми данными об обмене рецепторов белково-пептидных гормонов. В культуре лимфоцитов человека обмен рецепторов СТГ и инсулина был определён путём блокирования их синтеза циклогексимидом: период полужизни для рецепторов СТГ и инсулина равнялся 10 и 30–40 ч соответственно.

Среди факторов, которые регулируют концентрацию гормональных рецепторов, в первую очередь, можно выделить уровень самого гормона. При этом имеет место обратная корреляция между концентрацией гормона и числом соответствующих рецепторов на плазматической мембране компетентных клеток.

В последние годы предпринимаются попытки выяснения механизмов снижения числа гормональных рецепторов при повышении воздействия на них агонистов. При изучении обмена субъединиц рецептора инсулина в мембранах культуры лимфоцитов человек для определения скорости деградации рецепторов использовали мечение лимфоцитов ^{35}S-метионином и поверхностные белки лимфоцитов, меченные $Na^{125}I$ с помощью лактопероксидазы. Установлено, что период полужизни основных субъединиц рецептора (135 000 и 95 000) составляет 9–12 ч в нормальной среде. При добавлении в культурную среду инсулина (1 мкМ) обмен субъединиц ускорялся

в 2,5–3,5 раза (период полужизни < 3 ч). Ускорение деградации рецептора зависело от концентрации инсулина и коррелировало с инсулинзависимым снижением числа рецепторов. Соматотропин человека не влиял на обмен инсулиновых рецепторов. Циклогексимид (100 мкМ) частично блокировал инсулинзависимое ускорение деградации рецептора. Скорость биосинтеза рецепторов не изменялась в присутствии инсулина. Эти данные позволяют заключить, что инсулинзависимое исчезновение рецепторов в лимфоцитах человека обусловлено ускорением деградации рецепторов. Такой же вывод можно сделать и об индуцированной инсулином даун-регуляции инсулиновых рецепторов в адипоцитах линии 3T3 L1. В этом случае скорость синтеза инсулиновых рецепторов, определяемая по включению ^{15}N-, ^{13}C- и ^{2}H-аминокислот, не изменялась как после удаления инсулина, так и после его добавления к среде инкубации в концентрации 1 мкМ. При отсутствии инсулина в среде инкубации время полужизни рецепторов инсулина увеличивалось с 8,1 до 14,8 ч, а в его присутствии снижалось до 6,9 ч. Клетки с увеличенным числом рецепторов обнаруживали в 2 раза более активный транспорт ^{14}C-глюкозы, индуцированный инсулином (10^{-9} М) в сравнении с клетками со сниженным числом рецепторов.

По нашему мнению, одним из путей деградации инсулиновых и других рецепторов является повышение интернализации комплексов гормон–рецептор при увеличении взаимодействия гормона на клетку. После интернализации гормон-рецепторный комплекс может оказаться в лизосомах (образуются так называемые фаголизосомы), где он подвергается деградации. Однако необходимо отметить, что разрушается не весь пул интернализованного рецептора. Часть рецептора может по обратному пути рециклироваться и снова появиться на поверхности клеток. По-видимому, в клетке существуют специальные механизмы регуляции между деградацией и рециклированием гормональных рецепторов, что создаёт оптимальный уровень рецепторов на плазматической мембране клеток и внутри них, и тем самым обеспечивает необходимую для клетки чувствительность к гормональному сигналу. Кроме того, следует учитывать возможность полной обратимости снижения числа инсулиновых рецепторов на поверхности компонентных клеток, вызванной однократной инъекцией инсулина. 5-Кратное увеличение концентрации инсулина в плазме крыс сопровождается снижением связывания ^{125}I-инсулина с плазматическими мембранами печени на 20–25% (максимум через 5–15 мин), восстановления до исходного уровня через 1 ч, но увеличением связывания гормона с мембранами фракции комплекса Гольджи клеток печени на эту же величину в те же сроки. Поэтому можно считать, что повышение уровня инсулина в физиологическом интервале концентраций вызывает быструю и обратимую транслокацию инсулиновых рецепторов с поверхности внутрь клетки без изменения их общего числа. Вероятно, имеется ещё и пострецепторный механизм регуляции чувствительности клеток к гормонам. Индуцируемая инсулином «регуляция снизу» рецепторов в культивируемых клетках гепатомы крысы происходит уже при концентрации инсулина в среде 0,3 нг/мл, полумаксимальной она становится при концентрации 10–20 нг/мл и максимальной — при его концентрации 100 нг/мл. После удаления инсулина из среды клетки восстанавливают способность связывать инсулин, начиная с 2–4 ч до 24 ч, когда число рецепторов инсулина становится таким же, как в норме. В то же время восстановление чувствительности клеток к инсулину, измеряемое по стимуляции инсулином транспорта α-аминоизомасляной кислоты через мембрану, возвращалось к норме уже через 2 ч после удаления инсулина из среды. Уменьшение числа рецепторов на 50–60% было недостаточным для полной потери чувствительности клеток к инсулину. Этот факт, а также несовпадение времени восстановления числа рецепторов и чувствительности клеток к инсулину указывают, что десенситизация клеток объясняется не «регуляцией снизу», а включает некий пострецепторный механизм.

Как и следовало ожидать, рецепторы гормонов находятся под генетическим контролем. Установлено, что у мутантных мышей, несущих в гомозиготном состоянии летальные мутации в виде индуцированных радиоактивным излучением делеций в локусе, детерминирующем альбинизм, хромосомы 7 и около него, нарушена нормальная регуляция ряда зависимых от инсулина ферментов печени. В клетках печени новорождённых гомозиготных мышат с летальной мутацией ^{14}CoS и в выделенных из клеток мембранах содержание рецепторов инсулина составило 20–25% от нормы, а сродство рецепторов к инсулину было таким же, как в норме. Активность инсулиназы, разрушающей инсулин, не отличалась от контроля. Эти данные свидетельствуют о том, что структурный ген инсулинового рецептора у мутантов не повреждён, а делеция касается генов, участвующих в регуляции инсулинового рецептора, например процессинга рецептора, его транспорта или встраивания в клеточную мембрану. В результате снижения числа рецепторов в мембране нарушается зависимая от инсулина регуляция дифференцировки клеток печени.

Хорошо известно также, что у мышей с врождённым ожирением (линия ob/ob) имеет место снижение числа инсулиновых рецепторов на гепатоцитах, адипоцитах, тимоцитах и мышце сердца на 50–70% без изменения сродства рецепторов к инсулину. Однако изменений активности 5'-нуклеотидазы и аденилатциклазы, а также числа рецепторов к глюкагону, СТГ и изопротеренолу у этих мышей не наблюдается.

Ещё одним фактором модификации гормональных рецепторов могут быть модуляторы, действующие опосредованно на тот или иной тип рецептора. Примером этого утверждения могут быть данные о том, что обработка гранулозных клеток крыс фоллитропином концентрацией 1, 10 и 100 нг/мл в течение 2 сут приводит к увеличению пролактиновых рецепторов в 3,85, 5,7 и 5,7 раз соответственно. Обработка этих клеток холерным токсином (10 мкг/мл) в течение 2 дней вызывала увеличение числа пролактиновых рецепторов в 2 раза. Вместе с тем одновременная обработка клеток гонадолиберином (10^{-8} М) и фоллитропином (10 мг/мл) снижала число пролактиновых рецепторов на 64% по сравнению с клетками, обработанными только фоллитропином. Ингибирующее действие гонадолиберина предотвращалось его антагонистом D-Glu^1, D-Phe^2, D-Trp. Воздействие хориогонадотропином или лютропином на клетки, которые предварительно инкубировали с фоллитропином, приводило к увеличению числа пролактиновых рецепторов в 2 раза по сравнению с клетками, обработанными предварительно только фоллитропином. Следовательно, можно считать, что фоллитропин, лютропин и хориогонадотропин непосредственно увеличивают число пролактиновых гранулезных клеток, а гонадолиберин, действуя через свои рецепторы, ингибирует вызываемое фоллитропином повышение числа этих рецепторов. Увеличение числа рецепторов к ЛГ также наблюдается в семенниках крыс при введении им СГ или пролактина, и в гранулозных клетках фолликулов свиней при воздействии ФСГ или холерного токсина — агентов, повышающих внутриклеточный уровень цАМФ.

По-видимому, в регуляции числа рецепторов белково-пептидных гормонов может принимать участие цАМФ. В этом аспекте представляют интерес данные о том, что обработка культивируемых клеток щитовидной железы крысы 1 мМ 8-Br-цАМФ при 37 °С приводит к кластеризации рецепторов флюоресцентного конъюгата тиреотропина с тетраметилродаминизоцианатом и уменьшению синтеза цАМФ в ответ на действие тиреотропина.

Знание механизма регуляции как числа рецепторов, так и сопряжения их с эффекторными системами имеет большое значение для практической медицины, до сих пор не решившей проблемы лечения многих эндокринных заболеваний.

Через 10 сут после адреналэктомии у крыс усиливается связывание инсулина с инсулиновыми рецепторами плазматических мембран жировых клеток за счёт уве-

личения числа рецепторов, а при гиперкортицизме происходит угнетение экспрессии инсулиновых рецепторов этих мембран (уменьшается число и их сродство к гормону). Эти данные, а также результаты других авторов свидетельствуют о сложном и, по-видимому, непрямом действии глюкокортикоидов на инсулиновые рецепторы.

Изменение концентрации инсулиновых рецепторов и их связывающей способности нередко встречается при развитии устойчивости к инсулину. Устойчивость к инсулину, как правило, имеет место у тучных людей. У них при стабильности метаболизма биологически активного инсулина наблюдается снижение связывания инсулина с моноцитами, обусловленное уменьшением концентрации инсулиновых рецепторов. В соответствии с представлениями о «регуляции снизу» гормональных рецепторов, чем больше гиперинсулинемия, тем сильнее уменьшается число инсулиновых рецепторов, и наоборот. Поэтому снижение калорийной пищи является одним из способов увеличения биологической активности инсулина как при ожирении, так и при диабете. Отсюда понятно, почему при лечении больных диабетом нет прямой зависимости между дозой инсулина и его эффектами.

Причиной устойчивости к инсулину может быть наличие специфических антител против инсулиновых рецепторов, которые уменьшают связывание инсулина с рецепторами на 70–95 %.

Таким образом, развитие устойчивости к инсулину может быть связано с увеличением уровня инсулина в крови, снижением концентрации инсулиновых рецепторов, наличием антител против инсулиновых рецепторов и нарушением функции этих рецепторов. Для диагностики причины инсулиновой устойчивости можно применять тест на определение связывающей способности инсулиновых рецепторов моноцитов. В качестве средств, увеличивающих число инсулиновых рецепторов и не влияющих на уровень инсулина в крови, можно использовать производные сульфонилмочевины.

Мембраны гепатоцитов новорождённых крыс по сравнению с взрослыми животными связывали больше инсулина. Рецепторы инсулина у крыс разного возраста не отличались по своей специфичности к его аналогам. Однако скорость деградации ^{125}I-инсулина у новорождённых крыс была в 3 раза ниже, чем у взрослых. Число инсулиновых рецепторов после первых суток постнатального развития уменьшалось и через 3 недели не отличалось от их числа у взрослых крыс. По мнению авторов, инсулиновые рецепторы у новорождённых и взрослых крыс функционально близки, но у новорождённых содержится большее число этих рецепторов. Приведённый факт, а также, возможно, уменьшенная способность к десенситизации рецепторов в печени зародыша могут обусловить повышение запасов гликогена и ускорение роста органа в процессе пренатального развития. В этой связи представляют интерес данные о том, что дифференцировка культивируемых преадипоцитов 3T3 L1 в адипоциты сопровождается увеличением содержания рецепторов инсулина в 10–20 раз. При этом инсулин почти не влияет на содержание рецепторов и на скорость их деградации в дифференцированных клетках.

Таким образом, описанные результаты позволяют сделать вывод, что обмен, а значит и функции гормональных рецепторов, могут изменяться под воздействием различных факторов. К таковым относят уровень самого гормона, возраст, степень дифференцировки клетки, а также наличие модуляторов, в качестве которых могут выступать различные физиологически активные вещества.

Мы считаем, что дальнейшие исследования, направленные на выяснение обмена рецепторов белково-пептидных гормонов при различных заболеваниях, старении, физической нагрузке и экстремальных воздействиях помогут нам приблизиться к пониманию как физиологических процессов развития организма млекопитающих, так и патогенеза многих заболеваний.

6.7. Заключение

На основании изложенного материала могут быть сформулированы следующие выводы.

1. Рецепторами белково-пептидных гормонов являются генетически детерминируемые белковые комплексы, имеющие олигомерную структуру. Их функция заключается в узнавании, специфическом связывании гормонов на поверхности клеток, интернализации гормонов внутрь клеток и передачи гормонального сигнала эффекторным системам, как на уровне плазматической мембраны, так и органелл клеток.

2. Рецепторы белково-пептидных гормонов гетерогенны, конформационно подвижны, обладают способностью к кластеризации, интернализации, «регуляции снизу» и рециклизации.

3. Функционирование рецепторов белково-пептидных гормонов зависит от концентрации катионов, сульфгидрильных групп, гуаниновых нуклеотидов, дифференцировки клеток.

Мы надеемся, что детальное изучение всех аспектов функционирования рецепторов белково-пептидных гормонов должно позволить раскрыть механизмы развития не только различных заболеваний, но и процессов старения, так как именно возрастные изменения в чувствительности тканей к гормонам являются одной из причин роста, развития, старения и смерти живого организма.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 6

1. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М.–Волгоград: Семь ветров, 1999. С. 640.
2. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М.: Фарммединфо, 1996. С. 384.
3. *Aguirre V., Wener E.D., Giraud J., Lee Y.H., Shoelson S.E., White M.F.* Phosphorylation of Ser(307) in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 1531–1537.
4. *Balaban S., Nemoto S., Finkel T.* Mitochondria, oxidants and aging // Cell. 2005. V. 120. P. 483–495.
5. *Bluher M., Kahn B., Kahn C.* Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue // Science. 2003. V. 299. P. 572–574.
6. *Brachmann S.M., Ueki K., Engelman J.A., Kahn R.C., Cantley L.C.* Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 1596–1607.
7. *Droge W.* Oxidative enhancement of insulin receptor signaling experimental findings and clinical implications // Antioxid. Redox. 2005. Signal. V. 7. P. 1071–1077.
8. *Droge W.* Oxidative aging and insulin receptor signaling // J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci. 2005. V. 60. P. 1378–1385.
9. *Engelman J.A., Lujo J., Cantley L.C.* The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 606–619.
10. *Furukawa N., Ongusaha P., Jahung W.J., Araki K., Choi C.S., Kim H.J., Lee Y.H., Kaibuchi K., Kahn B.B., Masuzaki H., Kim J.K., Lee S.W., Kim Y.B.* Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis // Cell Metab. 2005. V. 2. P. 119–129.
11. *Ghezzi P., Bonetto B., Fratelli M.* Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation // Antioxid. Redox. Signal. 2005. V. 7. P. 964–972.
12. *Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pellici P.B. et al.* Electron transfer between cytochrome c and p66shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis // Cell. 2005. V. 122. P. 221–233.
13. *Goldstein B.J.* Protein-tyrosine phosphatases and the regulation of insulin action // In: Diabetes Mellitus: A fundamental and Clinical TGext / Ed. D. LeRoith. S.I. Taylor, J.M. Olefsky. V. 3. — Philadelphia: Lippincott, 2003. P. 255–268.
14. *Goldstein B.J., Mahadev K., Wu X., Zhu L., Motoshima H.* Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway // Antioxid. Redox. Signal. 2005. V. 7. P. 1021–1031.
15. *Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Geloen A., Even P., Cervera P., Le Bouc Y.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice // Nature. 2003. V. 421. P. 182–187.
16. *Humphries K.M., Sweda P.A., Szweda L.I.* Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage // Free Radic. Res. 2007. V. 40. P. 1239–1243.
17. *Kim J.K., Fillmore J.J., Sunshine M.J., Albrecht B., Higashimori T., Kim D.W., Liu Z.X., Soos T.J., Cline G.W., O'Brien W.E., Littman D.R., Shulman G.I.* PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance // J. Clin. Invest. 2004. V. 114. P. 823–827.
18. *Klaman L.D., Boss O., Peroni O.D., Kim J.K., Martino J.L., Zabolotny J.M., Moghal N., Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E., Zunder E.R., Goldenberg D.D., Williams O., Loewith R., Stokoe D., Balla A., Toth B., Balla T., Weiss W.A., Williams R.L., Shokat K.M.*

A pharmacological map of PI3K. family defines a role for p110α in insulin signaling // Cell. 2006. V. 125. P. 733–747.

19. *Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E. et al.* A pharmacological map of PI3K family defines a role for p110a in insulin signaling // Cell. 2006. V. 125. P. 733–747.
20. *Mahadev K., Wu X., Zilbering A., Zhu L., Lawrence J.T., Goldstein B.J.* Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 48662–48669.
21. *Moeschel K., Beck A., Weigert C., Lammers R., Kalbacher H., Voelter W., Schleicher E.D., Haring H.U., Lehmann R.* Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser(318) in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1 // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 25157–25163.
22. *Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., Finkel T.* The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 10555–10560.
23. *Potashnik R., Bloch-Damati A., Boshan N., Rudich A.* IRS-1 degradation and increased serine phosphorylation cannot predict the degree of metabolic insulin resistance induced by oxidative stress // Diabetologia. 2003. V. 46. P. 639–648.
24. *Samuel V.T., Liu Z.X., Qu X., Elder B.D., Bilz S., Befroy D., Romanelli A.J., Shulman G.I.* Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 32345–32353.
25. *Sattar A.A., Berhanu C., Gebreselassie S., Berhanu P.* Human insulin receptor juxtamembrane domain independent insulin signaling // Cell Biol. Int. 2007. V. 31. P. 815–824.
26. *Shelton M.D., Chock P.B., Mieyal J.J.* Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation // Antioxid. Redox. Signal. 2005. V. 7. P. 348–366.
27. *Srivastava A.K.* Redox regulation of insulin action and signaling // Antioxid. Redox. Signal. 2005. V. 7. P. 1011–1013.
28. *Taniguchi C.M., Aleman J.O., Ueki K., Luo J., Asano T., Kaneto H., Stephanopoulos G., Cantley L.C., Kahn C.R.* The p85α regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinsae potentiates c-Jun N-terminal kinase-mediated insulin resistance // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. P. 2830–2840.
29. *Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn C.R.* Critical nodes of signaling pathways: insights into insulin action // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2006. V. 7. P. 85–96.
30. *Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Gurnani P., Nandi A., Kurosu H., Mityoshi M., Ogawa Y., Castrillon D.H., Rosenblatt K.P., Kuro-o M.* Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 38029–38034.
31. *Papaconstantinou J.* Insulin / IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination // Molecular and Cellular Endocrinology. 2009. V. 299, № 1. P. 89–100.

Глава 7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ (ОПИОИДОВ)

Наркотические анальгетики (лиганды опиоидных рецепторов) имеют более чем 5000-летнюю историю применения в медицине. Анальгетический и наркотический эффекты опия (от греч. *opos* — сок) использовались египетскими врачами; его описывали Гиппократ и Гален. Тысячелетиями опий применяется в восточной медицине. С древних времён курение опия распространено в исламских государствах, таких как Саудовская Аравия, Турция, Иран. Опий также используется в традиционной медицине Китая и Индии.

В 1805 г. немецкий химик Фридрих Сертюрнер выделил из опия активный компонент, названный впоследствии морфином. Первый полусинтетический аналог морфина — героин был получен в 1898 г.

Однако лишь во 2-й половине XX в. удалось определить молекулярные механизмы действия опиоидных лигандов. В 1973 г. в связи с развитием техники радиорецепторных исследований одновременно три группы исследователей (Pert, Snyder, 1973; Simon и др., 1973; Terenius, 1973) сообщили о химической идентификации этих рецепторов. Через два года было показано существование более чем одного типа центров связывания опиоидных пептидов.

Открытие опиоидных рецепторов — это наиболее существенное современное достижение фармакологии опиоидов за последние тысячелетия. Это открытие способствовало не только развитию путей направленного воздействия наркотических анальгетиков при тех или иных заболеваниях, но и позволило сделать шаг вперёд в изучении нейрохимических механизмов восприятия боли, памяти, поведенческих реакций [1, 2].

7.1. Лиганды опиоидных рецепторов

Первые лиганды опиоидных рецепторов, которые стали известны исследователям (морфин, норморфин, гидроморфин), имели природное происхождение. Первым полусинтетическим агонистом был героин (диацетилморфин). Первый антагонист опиоидных рецепторов, налоксон, был получен в 1940-х годах. Химическая структура этих лигандов представлена на рис. 7.1.

В 1975 г. J. Hughes и др. в экстрактах мозговой ткани обнаружили эндогенные лиганды опиоидных рецепторов, которые, подобно морфину, ингибировали электрически стимулируемые сокращения *vas deferens* мышей и отрезка изолированной подвздошной кишки морской свинки. Эти эндогенные лиганды оказались пентапептидами и получили название метионин- и лейцин-энкефалинов (мет- и лей-энкефалины). Одновременно H. Teschemacher и др. (1975), используя технику экстракции, применяемую для выделения пептидных гормонов, идентифицировали в гипофизе быка опиоидный пептид, отличающийся от энкефалинов, но также оказывающий стереоспецифическое действие на опиатные рецепторы. Этот пептид был назван эндорфином. Последующее изучение эндогенных опиатоподобных пептидов позво-

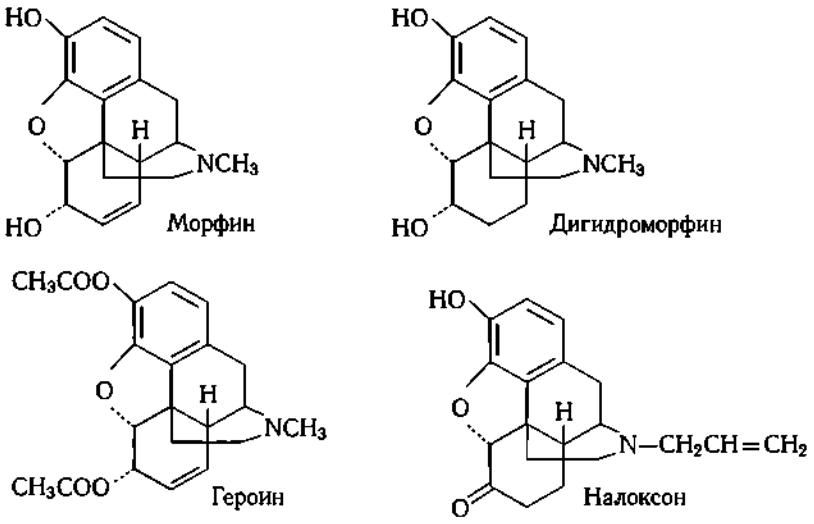


Рис. 7.1. Химическая структура лигандов опиоидных рецепторов

лило установить, что их предшественниками являются проопиомеланокортин, проэнкефалин А и проэнкефалин В. Проопиомеланокортин содержит в своём составе β-эндорфин, АКТГ и α-, β- и γ-меланоцитстимулирующие гормоны; он синтезируется в передней и промежуточной долях гипофиза, гипоталамусе, других областях головного мозга и в некоторых периферических тканях, включая плаценту, ЖКТ и лёгкие. В передней доле гипофиза крыс проопиомеланокортин расщепляется на АКТГ и β-липотропин. Функция последнего ещё недостаточно изучена. Считают, что β-липотропин принимает участие в высвобождении β-эндорфина [1–12].

В промежуточной доле гипофиза АКТГ подвергается дальнейшему расщеплению и превращается в α-меланоцитстимулирующий гормон и кортикотропиноподобный пептид, а из β-липотропина образуется β-эндорфин и γ-липотропин. По-видимому, процессинг гена, кодирующего проопиомеланокортин, в передней и промежуточной долях гипофиза различен. По мнению J.L. Marx (1983), процессинг этого гена в гипоталамусе и других отделах головного мозга также характеризуется отличительными особенностями, но точных сведений о нём пока нет. По нашему мнению, важен тот факт, что транскрипция гена проопиомеланокортина регулируется глюкокортикоидами. Именно на этом уровне может осуществляться взаимодействие между эндокринной и анальгезирующей системами.

Изучение аминокислотного состава проэнкефалина А показало, что он является предшественником мет- и лей-энкефалинов и некоторых других энкефалинсодержащих пептидов. В свою очередь проэнкефалин В содержит α-неоэндорфин, динорфины А и В и лей-энкефалин. Проопиомеланокортин и проэнкефалины А и В имеют сходные размеры и одинаковое расположение их интронов; все они содержат шесть цистеиновых остатков, сгруппированных вокруг N-конца.

Препроэнкефалина В содержит кроме динорфина и β-неоэндорфина ещё один опиоидный пептид (24 аминокислотных остатка), названный леуморфином.

E. Roti и др. (1984) сообщили ещё об одном опиоидном пептиде — деморфине, который оказывает стимулирующее действие на секрецию тиреотропина у мышей. В последующем было охарактеризовано несколько близкородственных пептидов, названных дельторфинами. По всей видимости, дерморфин и дельторфин синтезируются из одного предшественника — продерморфина.

Сравнительно недавно описано семейство казоморфинов, которые впервые были выделены из бычьего казеинового пептона. β-Казоморфины предпочтительно действуют на μ-опиоидные рецепторы, оказывая физиологическое действие на ЖКТ, увеличивая высвобождение инсулина. Другой структурно сходный с β-казоморфином пептид назван цитохрофином, поскольку является фрагментом митохондриального цитохрома *b*.

Совершенно иного класса опиоидные пептиды, входящие в состав гемоглобина, были названы геморфинами и цитохрофинами. Впервые эти пептиды были получены *in vitro* под действием трипсина; однако в последние годы появились данные, что геморфины могут образовываться *in vivo*.

В ЦНС обнаружены эндогенные пептиды, селективно взаимодействиующие с μ-опиоидными рецепторами, а также пептид ноцицептин, который, как предполагают, взаимодействует с ещё не описанным типом опиоидных рецепторов. Кроме пептидных лигандов опиоидных рецепторов в головном мозге и надпочечниках обнаружены лиганды непептидной природы: морфин и кодеин.

7.2. Классификация опиоидных рецепторов

Опиоидные рецепторы являются гетерогенной популяцией. Описано 5 типов опиоидных рецепторов: δ, μ, $\varkappa$, σ и ϵ. Следует иметь в виду, что ни для одного типа опиоидных рецепторов не описано специфического агониста или антагониста; все опиоидные агонисты/антагонисты в той или иной степени могут взаимодействовать с различными типами опиоидных рецепторов. Однако для каждого типа опиатных рецепторов описаны наиболее типичные агонисты.

Для δ-опиатных рецепторов наиболее типичными агонистами являются N-аллилнорметазоцин, энкефалины, [D-Ala2,D-Leu]-энкефалин (DADLE); для μ-опиатных рецепторов — [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly-ol5]-энкефалин (DAGO); для $\varkappa$-рецепторов — динорфины, ЕКС, бремазоцин, U-50,488; для σ-рецепторов типичным агонистом является соединение SKF-10047 и для ϵ-опиатных рецепторов наиболее типичный агонист — β-эндорфин.

λ-Опиоидным рецепторам отводится функция лабильных налоксон-связывающих рецепторов. Имеются также данные о существовании на иммунокомпетентных клетках налоксон-нечувствительных опиоидных рецепторов, а на клетках нервной системы — специфических рецепторов для ноцицептина. Предполагается, что эти рецепторы опосредуют анальгетический эффект данного пептида.

Наиболее полно охарактеризованы μ-, δ- и $\varkappa$-опиоидные рецепторы. С помощью синтетических высокоспецифичных лигандов показано, что эти типы опиоидных рецепторов также гетерогенны. В частности, для $\varkappa$-опиоидных рецепторов описаны даже $\varkappa_{1b}$-субтипы, $\varkappa_{2a}$- и $\varkappa_{2b}$-субтипы, $\varkappa_{2a\text{-}1}$-, $\varkappa_{2a\text{-}2}$-, $\varkappa_{2b\text{-}1}$- и $\varkappa_{2b\text{-}2}$-субтипы [13].

7.3. δ-Опиоидные рецепторы

δ-Опиоидные рецепторы были впервые охарактеризованы в мышином *vas deferens*, где энкефалины сильнее, чем морфин, ингибируют потенциалзависимое высвобождение медиатора в синаптическую щель.

Радиорецепторные исследования со специфическими лигандами позволили охарактеризовать два субтипа δ-опиатных рецепторов: δ_1 и δ_2. Для δ_1-рецепторов типичными агонистами являются [D-Pen2, D-Pen5]-энкефалин и 7-бензилдеэтилналтрексон, для δ_2-рецепторов — [D-Ala2, Glu4]-дельторфин, типичный антагонист — налтрибен.

В настоящее время распределение δ-опиоидных рецепторов охарактеризовано авторадиографически. δ-Опиодиные рецепторы имеют наиболее сложное распределение

в организме, по сравнению со всеми остальными типами опиатных рецепторов. В центральной нервной системе наибольшая концентрация δ-опиоидных рецепторов наблюдается в обонятельной луковице, новой коре, хвостатом и добавочном ядрах. В таламусе, гипоталамусе и стволе мозга концентрация δ-опиоидных рецепторов невелика. В ЦНС δ-опиоидные рецепторы располагаются в основном на пресинаптической мембране. По всей видимости, они оказывают ингибирующее воздействие на высвобождение ряда нейротрансмиттеров (субстанция Р, кальцитонин-релизинг-пептид и др.). В спинном мозге и симпатическом стволе обнаружено лишь незначительное число δ-опиатных рецепторов.

В фундальной части желудка крысы обнаружены высокие концентрации δ-опиоидных рецепторов, располагающихся в циркулярном слое мышц, ауэрбаховском сплетении и непосредственно под слизистой оболочкой. В других участках желудка концентрация δ-опиоидных рецепторов не столь велика, а связывание δ-агонистов происходит в подслизистом сплетении и слизистой оболочке.

В двенадцатиперстной кишке δ-рецепторы распределены в основном в слизистой оболочке, в ворсинках и у основания ворсинок. В мышечном слое связывания δ-агонистов не обнаружено. Сходное распределение δ-рецепторов обнаружено в подвздошной кишке крысы; однако у морской свинки связывания δ-агонистов в подвздошной кишке не происходит.

Наиболее изученным является распределение периферических δ-опиоидных рецепторов на клетках иммунной системы. На Т- и В-клетках, а также спленоцитах человека и мыши обнаружена экспрессия δ-опиодных рецепторов. δ-Опиоидные рецепторы экспрессируются только на Т-лимфоцитах CD4+ и CD8+ мыши, показано наличие δ_1-рецепторов на Т-клетках человека.

Следует отметить, что экспрессия δ-опиоидных рецепторов на клетках иммунной системы во многих случаях определяется функциональным состоянием этих клеток. Так, после 24-часовой инкубации с КонА экспрессия δ-рецепторов на спленоцитах мыши существенно снижается.

Блокада экспрессии δ_1- или δ_2-опиоидных рецепторов зависит от участка мРНК, к которому подобраны антисмысловые олигонуклеотидные последовательности. Можно предположить, что различия между субтипами δ-опиоидных рецепторов происходят из-за существования альтернативного сплайсинга ДНК.

δ-Рецепторы выполняют многие функции, участвуя в анальгезии, интеграции двигательной активности, регуляции моторики ЖКТ, обонянии, дыхании, распознавательных (когнитивных) функциях, в регуляции настроения и эмоций и т. д. Доказано, что δ-рецепторы принимают участие в регуляции тонуса сердечно-сосудистой системы, оказывая центральный гипотензивный эффект. Показано, что активация δ-опиоидных рецепторов может приводить к угнетению дыхания, снижению частоты дыхания, преимущественно за счёт удлинения экспираторной фазы. Также известно, что центральные и периферические δ-рецепторы участвуют в снижении ряда функций ЖКТ, влияя на моторику и секрецию соляной кислоты в желудке. Спинномозговые рецепторы участвуют в антиноциепции, вероятно за счёт ингибирования субстанции Р. При введении в спинной мозг δ-агонистов снижается болевая чувствительность в ответ на температурные или химические воздействия.

7.4. μ-Опиоидные рецепторы

Описаны следующие μ-субтипы рецепторов: μ_1-типичные агонисты: дигидроморфин, оксиморфоназин; специфический необратимый антагонист налоксоназин и μ_2-агонисты — морфин, дигидроморфин, DAGO, кетоциклазоцин, μ_3-агонисты —

морфин, алкалоиды. μ_1- и μ_2-Опиоидные рецепторы имеют повсеместное распространение в организме, тогда как μ_3-рецепторы встречаются только на клетках ненейронального происхождения (иммуноцитах и микроглиальных клетках). Последнему субтипу μ-рецепторов отводится роль рецепторов, специфически связывающих эндогенный морфин; кроме того, эти рецепторы с очень высокой аффинностью связывают алкалоиды. Однако μ_3-рецепторы практически не изучены, поэтому все приводимые ниже сведения относятся к μ_1- и μ_2-рецепторам.

Наиболее высокая концентрация μ-рецепторов наблюдается в хвостатом ядре. В высоких концентрациях эти рецепторы представлены в новой коре, таламусе, дополнительном ядре, гиппокампе и амигдале. В спинном мозге μ-рецепторы расположены в основном на пресинаптической мембране. Достаточно большое число μ-опиоидных рецепторов находятся в симпатическом стволе (до 60–70% общего числа опиоидных рецепторов). Умеренное количество μ-рецепторов найдено в околоводопроводном сером веществе, гипоталамусе, бледном шаре.

В теле желудка μ-рецепторы располагаются в подслизистом (мейснеровом) сплетении. У морских свинок μ-связывающие участки обнаружены также в ауэрбаховом сплетении. В двенадцатиперстной кишке μ-агонисты связываются в слизистом слое. Наибольшие концентрации μ-опиатных рецепторов наблюдаются в подвздошной кишке, где эти рецепторы выявляются в слизистом, подслизистом слоях, а также в межмышечном и подслизистом сплетении.

Морфин способен вызывать гипергликемию, однако связывания этого лиганда с гепатоцитами не обнаружено.

Высокоспецифические μ-агонисты обладают ярко выраженной анальгетической активностью, опосредуемой μ-рецепторами, которые расположены как в головном мозге, так и в спинном мозге. μ-Рецепторы опосредуют ряд важнейших физиологических функций. Они участвуют в процессах дыхания (угнетение дыхательного центра и повышение его чувствительности к гиперкапнии), регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, регуляции пищевого поведения, процессов обучения и памяти, терморегуляции, в регуляции синтеза и релизинга ряда гормонов. Кроме того, с μ-рецепторами связано развитие привыкания к наркотическим веществам и наркомании.

7.5. κ-Опиоидные рецепторы

Описаны следующие подтипы κ-рецепторов: κ_1-типичные агонисты — бремазоцин, динорфин, циклозацин; κ_2-типичные агонисты — бремазоцин, WIN 44,441, бензоморфан, [Arg6,Phe7]-мет-энкефалин; κ_3-агонисты — налмефен, дипренорфин, бремазоцин, циклазоцин.

Распределение κ-опиоидных рецепторов изучено слабо. Наибольшие концентрации этих рецепторов найдены в коре мозга, чёрной субстанции, ядрах ствола мозга. У крыс высокие концентрации κ-рецепторов найдены также в дополнительном ядре. В спинном мозге и симпатическом ганглии крыс обнаружены лишь незначительные концентрации κ-опиатных рецепторов.

Опиоидные рецепторы κ-типа обнаружены в ворсинках плаценты человека и не обнаружены у других млекопитающих. Показано, что эти рецепторы участвуют в регуляции процессов высвобождения ацетилхолина.

κ-Рецепторы обнаружены на клетках лимфомы, а также на ряде иммунных клеток. По всей видимости, это говорит об участии рецепторов данного типа в иммунных процессах, но роль их пока не ясна.

Роль κ-рецепторов заключается в регуляции болевой чувствительности, питьевой и пищевой мотивации. Возможно, что активация κ-рецепторов приводит к угне-

тению высвобождения антидиуретического гормона. Также $\varkappa$-опиодные рецепторы участвуют в процессах терморегуляции и модуляции кардиореспираторных функций. Введение $\varkappa$-агонистов у людей может приводить к развитию дисфонии.

7.6. Биохимические механизмы действия опиоидов

Для детального изучения биохимических свойств опиоидов многие годы предпринимались попытки выделить опиоидные рецепторы из биомембран в активной форме (солюбилизировать). Было показано, что опиоидные рецепторы сохраняют свои свойства в узком диапазоне температур: от 30 до 40 °С. При увеличении (снижении) температуры связывание опиоидных агонистов и антагонистов резко изменяется. По всей видимости, при снижении температуры ниже 30 °С или повышении более 40 °С происходит обратимое изменение конформации рецепторных белков. Кроме того, опиоидные рецепторы чрезвычайно pH-чувствительны; pH-оптимум для δ-рецепторов составляет 6,0–7,0 и 7,5–7,5 для μ-рецепторов.

Значительный прогресс в изучении биохимических свойств чистых опиоидных рецепторов связан с развитием молекулярно-биологических методов [14–16]. К настоящему времени рецепторные белки трёх основных типов опиоидных рецепторов (μ, δ, $\varkappa$) выделены и отклонированы. Опиоидные рецепторы разных типов отличаются по аминокислотной последовательности не более чем на 40%, при этом опиоидные рецепторы одного и того же типа, выделенные у разных животных, совпадают по аминокислотной последовательности более, чем на 90%. На приведённой модели мембранной топологии опиоидных рецепторов наиболее консервативные внутримембранные домены рецепторов отмечены тёмным цветом (рис. 7.2). Наибольшие различия между отдельными типами опиоидных рецепторов наблюдаются в С-конце.

Молекулярное клонирование показало, что опиоидные рецепторы сопряжены с G-белком и состоят из 7 трансмембранных доменов, 3 интрацеллюлярных и 3 экстрацеллюлярных петель. Экстрацеллюлярный N-конец рецептора имеет потенциальные участки гликозилирования: у δ- и $\varkappa$-опиоидных рецепторов их два, у μ-опиоидных рецепторов — пять. Различия в числе участков для гликозилирования приводят к существенным отличиям в молекулярной массе отдельных типов опиоидных рецепторов.

Были изучены фармакологические свойства отклонированных рецепторных белков в фибробластах обезьян и клеток, полученных из яичника китайского хомяка. Во всех случаях показано индуцированное агонистами этих рецепторов ингибирование аденилатциклазы.

При клонировании δ-опиоидных рецепторов, полученных из клеток человеческой нейроглиомы, из нервных клеток мышей и крыс, было показано, что эти рецепторы состоят из 372 аминокислот, 93% которых идентичны у животных разных видов. Наибольшим сродством к клонированным рецепторам из алкалоидов обладал дипренорфин, чуть меньшим — эторфин. Было показано, что связывание налтрибена с клонированными рецепторами вызывает ингибирование аденилатциклазы. Это позволяет предположить, что рекомбинантные δ-опиоидные рецепторы по фармакологическим свойствам являются δ_2-рецепторами.

Динорфин и его аналоги связываются с рекомбинантными отклонированными $\varkappa$-опиоидными рецепторами мыши, крысы и морской свинки с высокой аффинностью. Напротив, β-эндорфин связывается с этими рецепторами с чрезвычайно низкой аффинностью. Определение сродства рекомбинантных $\varkappa$-опиоидных рецепторов к различным лигандам позволило предположить, что они идентичны классическим $\varkappa_1$-рецепторам.

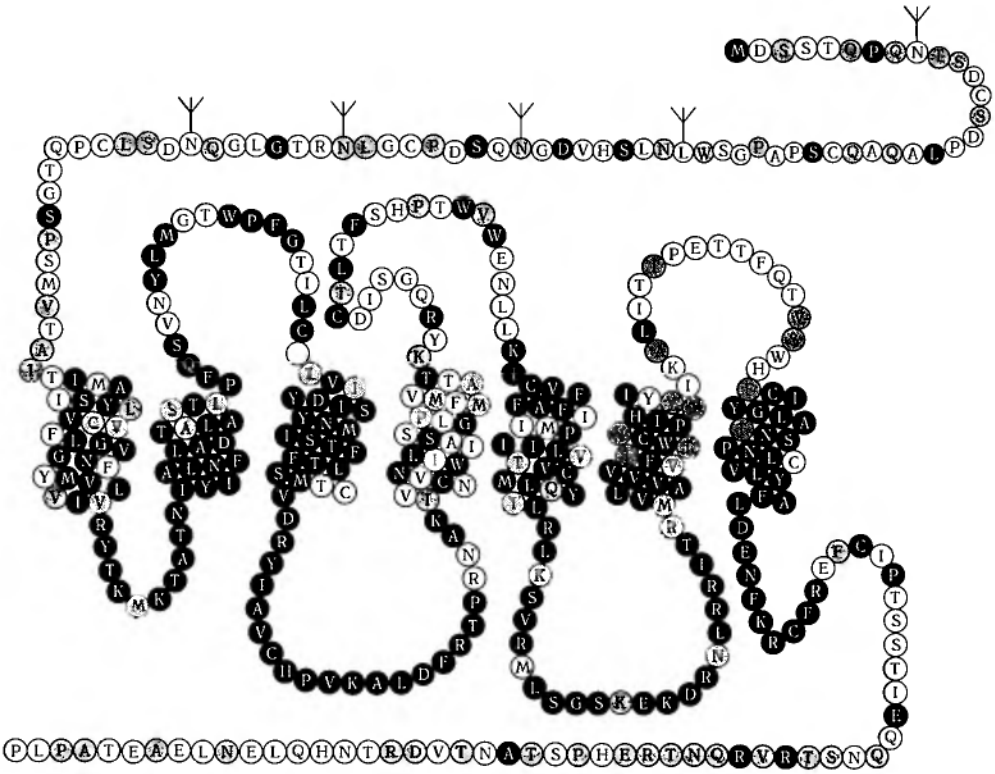


Рис. 7.2. Модель мембранной топологии опиоидного рецептора. Аминокислотный состав μ-опиоидного рецептора (ОР), консервативных δ- и $\varkappa$-ОР одновременно показан на рисунке чёрным цветом, отдельно δ- и $\varkappa$-ОР — серым цветом. Абсолютно не консервативная аминокислотная последовательность μ-ОР показана белым цветом. Значком $\curlyvee$ обозначены потенциальные участки гликозилирования

Клонированные μ-опиоидные рецепторы, выделенные из клеток крыс и человека, связывают, как энкефалины, так и β-эндорфин. На основании сравнения сродства различных лигандов к этим рецепторам было сделано предположение, что рекомбинантные μ-опиоидные рецепторы идентичны μ_1-рецепторам.

Для понимания молекулярного механизма действия опиоидов необходимо знать структуру лиганд-рецепторного комплекса на атомном уровне. Между способностью опиоидов ингибировать электрически вызываемые сокращения *vas deferens* и подвздошной кишки морской свинки и сродством их к мембранам головного мозга крыс имеется корреляция. Найдено, что ключевую роль во взаимодействии с опиоидными рецепторами играют тираминовая часть пептида и фенольное кольцо морфина.

Удаление или ацетилирование α-аминогруппы энкефалина сопровождается почти полной потерей фармакологической активности, что указывает на необходимость присутствия положительно заряженного атома азота, так же как и четвертичного атома в молекуле морфина для проявления его биологического действия. Присоединение аллильной группы к α-аминогруппе энкефалина приводит к появлению у него антагонистической активности; аллильное производное морфина (налоксон) также является сильным антагонистом. О-метилирование тирозинового гидроксила энкефалина вызывает падение его физиологической активности; О-метилированный морфин (кодеин) также обладает слабой активностью.

δ-Специфичность нециклических аналогов энкефалинов определяется гидрофильной боковой цепью остатка одной или нескольких аминокислот в положении 5, ароматическим остатком в положении 4, свободной COOH-группой в положении 5, удлинением последовательности добавлением триптофана.

Считается, что невзаимодействующие с опиоидными рецепторами глициновые остатки в положениях 2 и 3 энкефалина играют важную роль в создании оптимального пространственного расположения между тираминовой частью и липофильными остатками 4 и 5.

Присоединение пропил- или фенилэтильной группы к С-19 орипавина увеличивает его активность до уровня морфина, что указывает на наличие дополнительного липофильного участка в молекуле опиоидного рецептора, расположенного на расстоянии 1 нм от участка, связывающего фенольное кольцо лигандов.

Хотя эксперименты по солюбилизации опиатных рецепторов свидетельствуют, что они представляют собой белки или белковые комплексы, имеются также данные о том, что отрицательно заряженные лиганды играют существенную роль в связывании опиоидов. Действительно, цереброзидсульфат (3-О-сульфогалактозилцерамид) обладает большинством свойств опиоидных рецепторов ЦНС. ^{3}H-эторфин неспецифично связывается с липосомами, состоящими из холестерина и фосфатидилхолина, но такая специфичность появляется при добавлении к липосомам ганглиозидов G_{M2} и G_{M1} или сульфатида. ^{3}H-эторфин связывался также с экстрактом ганглиозидов гибридных клеток нейробластомы мышей NG108-15 и глиомы крыс NI8TG2, что указывает на возможную роль этих ганглиозидов в связывании опиатов с данными клетками. Таким образом, можно считать доказанным способность отрицательно заряженных гликолипидов связывать опиаты, но физиологическое значение этого связывания ещё неизвестно.

Включение липидов в клетки нейробластомы с помощью липосом потенцирует действие опиоидов на эти клетки. Включённый цереброзида сульфат обнаруживался во фракции плазматических мембран клеток, в которой определялась наибольшая активность опиоидных рецепторов и вся активность аденилатциклазы. Обработка клеток 10 мкМ цереброзида сульфата в течение 8 ч (но не добавление липосом непосредственно во время реакции) увеличивает как исходный уровень цАМФ, так и стимулированный простагландином E_1. Включение цереброзиа сульфата вызывало повышение сродства опиоидных рецепторов к ^{3}H-налоксону, но не увеличение числа опиоидных рецепторов ($K_д$ уменьшалась в 2 раза). Морфин не вызывал уменьшения активности аденилатциклазы клеток NI8TG2. как базальной, так и стимулированной простагландином E_1, однако включение цереброзида приводило к дозозависимому их ингибированию. При исследовании липидной специфичности выявлено, что для потенцирования опиатной активности необходимо включение цереброзида сульфата. Из всех других исследованных фосфолипидов только фосфатидилхолин потенцировал ингибирующий эффект опиатов. По мнению авторов, данный эффект цереброзида сульфата и фосфатидилхолина может быть обусловлен изменением активности мембранных трансметилаз I и II.

Сродство агонистов и антагонистов к данным рецепторам весьма чувствительно к воздействию и ионов, и гуаниновых нуклеотидов. Влияние Na^+ на это сродство хорошо изучено. Считается, что при отсутствии Na^+ опиоидный рецептор комплементарен агонисту, а в присутствии ионов натрия — антагонисту. Отметим, что другие ионы также регулируют взаимодействие лигандов с опиоидными рецепторами. Наряду с Na^+, K^+ и Li^+ заметно снижают величину специфического связывания агониста ^{3}H-D-Ala^2-Tyr-энкефалина с опиоидными рецепторами головного мозга крыс, тогда как Mg^{2+}, Mn^{2+} и Ca^{2+} заметно его усиливали.

Гуаниновые нуклеотиды (ГТФ, ГДФ и гуанозин-5′-(β,γ-имидо)трифосфат) ингибируют связывание опиоидных агонистов с мембраносвязанными опиоидными рецепторами клеток NG 108-15 (гибридные клетки нейробластомы и глиомы). Поэтому можно считать, что опиоидные рецепторы представляют собой комплекс опиоидсвязывающего белка с гуаниннуклеотидчувствительным компонентом.

Эффект ГТФ был более выражен для μ-рецепторов, чем для δ-рецепторов. Na^+, Mg^{2+} и ГТФ при совместном добавлении снижали сродство энкефалинов и других опиоидных агонистов к δ-рецепторам и сродство мет- и лей-энкефалинов к μ-рецепторам сильнее, чем Na^+ и ГТФ в отдельности, но три агента в меньшей степени снижали сродство D-Ala^2, Leu^5- и D-Ala^2, D-Leu^5-энкефалинов и морфина к μ-рецепторам, чем только Na^+ и ГТФ. Итак, количественные отличия в действии катионов и ГТФ на сродство лигандов к μ- и δ-рецепторам иллюстрируют различия этих рецепторов и сложное взаимодействие катионов и нуклеотидов с опиоидными рецепторами.

Для определения природы чрезвычайной чувствительности опиоидных рецепторов к ионам металлов строили корреляционные зависимости констант диссоциации различных металлов с рецепторами и с различными модельными соединениями (аминокислоты и др.). В случае δ-рецептора высокие значения коэффициента корреляции отмечаются для остатков фосфорной кислоты и фосфосерина, что указывает на участие фосфатной группы в рецепции δ-агонистов. При этом открытым остаётся вопрос: в состав какой молекулы (остатка) входит эта фосфатная группа? В равной мере это могут быть остатки серина или треонина или это могут быть фрагменты фосфолипидов мембран. Последнее предположение наиболее вероятно, так как были получены убедительные данные об участии фосфолипидов мембран в процессах рецепции опиоидов. Однако вопрос до сих пор остаётся открытым.

На основании анализа корреляционных зависимостей для μ-опиоидных рецепторов было показано, что центр связывания морфина содержит остатки гистидина. μ-Рецепторы чрезвычайно чувствительны к содержанию в среде ионов кальция и магния. Кроме того, параметры pH-зависимости μ-рецепторов близки к pH-зависимостям гистидина, что даёт основание думать, что именно гистидин ответствен за pH-чувствительность μ-рецепторов. Кроме того, участие гистидина в рецепции μ-лигандов подтверждают данные по химической модификации этих рецепторов диэтилпирокарбанатом (ДЭПК). Этот реагент при нейтральных значениях pH высокореактивен по отношению к имидазольным группам гистидина. Действительно, обработка мембранных препаратов, содержащих μ-рецепторы, приводит к существенному снижению специфического связывания μ-лигандов с мембранами, что подтверждает участие гистидина в процессах рецепции μ-лигандов.

Как и любая другая рецепция, рецепция опиоидными рецепторами их лигандов включает в себя не только процессы узнавания, но и процессы передачи сигнала в клетку. В настоящее время многие из этих процессов изучены достаточно подробно.

Аденилатциклаза. Детально вопросы сопряжения опиоидных рецепторов с аденилатциклазой были изучены на клеточной линии NG108-15. NG108-15-клетки являются гибридомной клеточной линией, полученной из клеток мышиной нейробластомы N18TG-2 и крысиной глиомы C6Bu-1. Эти клетки содержат только один тип опиоидных рецепторов, а именно: δ-рецепторы. Опиоиды ингибируют как спонтанную, так и индуцированную простагландинами аденилатциклазную активность клеток этой линии. Коклюшный токсин блокирует эффект опиоидов на аденилатциклазу NG108-15-клеток, что говорит об участии G_i/G_o-белка в ингибирующих эффектах опиоидов.

Ингибирующее влияние μ- и δ-агонистов на аденилатциклазу было также показано для многих регионов мозга, включая стриатум, таламус, и околоводопроводное

серое вещество. При этом было показано, что $\varkappa$-рецепторы не принимают участия в процессах ингибирования аденилатциклазы в указанных областях. Однако $\varkappa$-агонисты вызывали угнетение аденилатциклазной активности в мозжечке морских свинок.

Клонированные μ-, δ- и $\varkappa$-рецепторы вызывают угнетение аденилатциклазы в фибробластах обезьян и клетках яичника китайского хомячка. Этот эффект блокировался коклюшным токсином, что свидетельствует о сопряжении этих рецепторов с G_i/G_o-белками.

Показано стимулирующее воздействие опиоидов на аденилатциклазу через клонированные рецепторы. Этот эффект также блокировался коклюшным токсином. С классической точки зрения, аденилатциклаза угнетается $G_{i/o}$-белками. Однако была описана аденилатциклаза второго типа, которая стимулируется через $G_{i/o}$-белки. Аденилатциклаза второго типа, сопряжённая с опиоидными рецепторами, обнаружена в обонятельных луковицах крыс.

Кальциевые каналы. Активация μ-, δ- или $\varkappa$- опиоидных рецепторов приводит к ингибированию потенциал-зависимых кальциевых каналов. Этот эффект блокируется коклюшным токсином, что говорит об участии G_i- или G_o-белков в процессе внутриклеточной передачи рецепторного сигнала. Клонированные $\varkappa$-рецепторы на недифференцированных PC12-клетках также вызывали угнетение потенциалзависимых кальциевых каналов. Этот эффект блокировался коклюшным токсином.

Калиевые каналы. Показано, что активация μ- или δ-рецепторов приводит к активации потенциалзависимых калиевых каналов. Такая активация наблюдается в гиппокампе, нейронах желятинозной субстанции. Этот эффект также обнаружен при изучении клонированных μ-, δ- и $\varkappa$-рецепторов. Во всех случаях данный эффект блокировался коклюшным токсином, что говорит об участии G_o/G_i-белков в процессе внутриклеточной передачи сигнала.

7.7. Опиоидные рецепторы — мишень действия лекарственных средств

С открытием опиоидных рецепторов все наркотические анальгетики, исходя из особенностей их взаимодействия с опиоидными рецепторами, делят на агонисты, антагонисты и анальгетики со свойствами и агонистов, и антагонистов (частичные агонисты). В качестве наркотических агонистов в настоящее время используют морфин, героин (диацетилморфин), гидроморфин (его можно вводить перорально, в отличие от морфина и героина), кодеин, синтетические анальгетики морфинового ряда: оксикодон и леворфанол. Как наркотические анальгетики используют, кроме того, промедол, меперидин (медол) и его производные, а также метадон (фенадон) и его производные.

К частичным агонистам морфинового типа относятся пропирам, профадол и бупренорфин. Возможно, широкое применение найдёт бупренорфин, так как при сублингвальном введении он лишь в 10 раз слабее морфина как анальгетик. Бупренорфин длительно находится в плазме крови, и к нему очень слабо развиваются толерантность и физическая зависимость. К частичным агонистам налорфинового типа относятся пентазоцин, налбуфин, буторфанол, из которых наиболее широко используется пентазоцин. Однако при сильных болях его применение ограничено ввиду появления психомиметических эффектов с повышением дозы.

Хроническое введение опиоидов (иногда даже второе и третье) приводит к изменению концентрации опиоидных рецепторов. В экспериментах на животных показано, что изменение концентрации опиоидных рецепторов наблюдается в первую очередь в областях, ответственных за восприятие боли: околоводопроводное серое вещество,

чёрная субстанция. По-видимому, данный механизм является основой формирования синдрома привыкания к опиоидам.

Чистые антагонисты опиоидных рецепторов налоксон и налтрексон не обладают анальгетической активностью, но позволяют успешно бороться с острыми отравлениями морфином и его аналогами. Однако при хроническом отравлении морфином эти антагонисты не оказывают лечебного действия и, блокируя рецепторы, могут вызвать состояние абстиненции.

Важно отметить, что с опиоидными рецепторами могут взаимодействовать не только классические наркотические анальгетики, но и некоторые другие фармакологические вещества, в частности анестетик кетамин, обезболивающий эффект которого подавляется налоксоном.

Кетамин стереоспецифично вытесняет ^{3}H-гидроморфин из его связи с опиоидными рецепторами головного мозга крыс, а также ^{3}H-эторфин из различных областей головного мозга мышей *in vivo*, особенно из таламуса, но не из коры. Таким образом, эти результаты указывают на то, что обезболивающий эффект кетамина (главным образом его (+)-энантиомера) во многом может быть обусловлен взаимодействием с опиодными рецепторами.

Синтетический аналог энкефалинов — даларгин, нашёл применение для лечения некоторых форм язвенной болезни. В последние годы появились также данные об анксиолитическом действии данного препарата на крыс, зависящем, однако от исходного психоэмоционального состояния животных.

Развитие биохимической фармакологии опиоидных рецепторов позволяет создавать новые избирательные лекарственные вещества для борьбы с болью как среди экзогенных опиоидов, так и среди эндогенных опиоидных пептидов, увеличив их устойчивость к воздействию ферментов.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 7

1. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. Практический курс. — М.: Фаир-пресс, 1999. С. 404–476.
2. *Gumusel B., Hao Q., Hyman A., Chang J.K., Kapusta D.R., Lippton H.* Nociceptin: an endogenous agonist for central opioid like1 (ORL1) receptors possesses systemic vasorelaxant properties // Life Sci. 1997. V. 60, № 8. P. L141–L145.
3. *Herz A.* Endogenous opioid systems and alcohol addiction // Psychopharmacology (Berl). 1997. V. 129, № 2. P. 99–111.
4. *Lord J.A.H., Waterfield A.A., Hughes J.* Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors // Nature. 1997. V. 267, № 5611. P. 495–499.
5. *Narita M.M., Zoguchi H., Kampine J.P., Tseng L.F.* The effect of pretreatment with a delta 2-opioid receptor antisense oligodeoxynucleotide on the recovery from acute antinociceptive tolerance to delta 2-opioid receptor agonist in the mouse spinal cord // Bz. J. Pharmocol. 1997. V. 120, № 4. P. 587–592.
6. *Nestler E.J.* Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction // Curr. Opin. Neurobiol. 1997. V. 7, № 5. P. 713–719.
7. *Nyberg F., Sanderson K., Glomsta E.L.* The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin // Biopolymers. 1997. V. 43, № 2. P. 147–156.
8. *Rossi G.C., Leventhal L., Pan Y.X., Cole J., Su W., Bodnar R.J., Pasternak G.W.* Antisense mapping of MOR-1 in rats: distinguishing between morphine and morphine-beta-glucuronide antinociception // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. V. 281, № 1. P. 109–114.
9. *Sharp B.M., Shahabi N., Mckean D., Li M.D., McAllen K.* Detection of basal levels and induction of delta opioid receptor mRNA in murine splenocytes // J. of Neuroimmun. 1997. V. 78. P. 198–202.
10. *Yaksh T.L.* Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity // Acta Anaesthesiol Scand. 1997 V. 41, № 1. Pt 2. P. 94–111.
11. *Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J., Kastin A.J.* A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor // Nature. 1997. V. 386, № 6624. P. 499–502.
12. *Alfaras-Melainis K., Gomes I., Rozenfeld R. et al.* Modulation of opioid receptor function by protein-protein interactions // Frontiers in Bioscience. 2009. V. 14. P. 3594–3607.
13. *Zheng H., Loh H.H., Law P.Y.* Beta-arrestin dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) translocate to nucleus in contrast to G protein-dependent ERK activation // Mol. Pharmacol. 2008. V. 73. P. 178–190.
14. *Rozenfeld R., Devi L.A.* Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin 2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers // FASEB J. 2007. V. 21. P. 2455–2465.
15. *Feng G.J., Kellett E., Scorer C.A. et al.* Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 33400–33407.
16. *Liang Y.J., Wu D.F., Yang L.Q. et al.* Interaction of the mu-opioid receptor with synaptophysin influences receptor trafficking and signaling // Mol. Pharmacol. 2007. V. 71. P. 123–131.

Глава 8

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ПСИХОТРОПНЫХ СРЕДСТВ

К психотропным средствам относятся препараты для коррекции нарушений высшей нервной деятельности и расстройств эмоциональной сферы. Молекулярный механизм действия психотропных средств в основном объясняют их взаимодействием с рецепторами нейронов головного мозга [1–7]. Некоторые из их рецепторных эффектов представлены в табл. 8.1.

Таблица 8.1

Фармакологические эффекты, связанные с блокадой ряда рецепторов, играющих роль в механизме действия психотропных средств

Рецептор	Эффекты
Дофаминовые D_2-рецепторы	«Псевдопаркинсонизм», экстрапирамидные побочные эффекты, облегчение психоза
Гистаминовые H_1-рецепторы	Сонливость, прибавка веса
α_1-Адренорецепторы	Ортостатическая гипотензия, тахикардия
α_2-Адренорецепторы	Облегчение депрессии
Серотониновые $5\text{-}HT_{2A}$-рецепторы	Облегчение психоза, депрессии, тревоги
М-холинорецепторы	Нарушения зрения, сухость во рту, запор, задержка мочи, нарушения памяти

К современным психотропным средствам относятся следующие группы:
1) антипсихотические средства и нормотимики;
2) анксиолитики;
3) антидепрессанты;
4) психостимуляторы.

8.1. Антипсихотические средства и нормотимики

К антипсихотическим относятся средства для устранения продуктивной симптоматики психических расстройств — бреда, галлюцинаций, психомоторного возбуждения. Препараты данной группы объединяются названием «нейролептики». Несколько ранее была предложена группа средств для профилактики и сглаживания маниакальной симптоматики — «нормотимики». К нормотимикам относятся соли лития и некоторые противосудорожные средства (вальпроаты, карбамазепин). Они уступают по эффективности нейролептикам, но в ряде случаев легче переносятся при профилактическом приёме.

Нейролептики — средства, оказывающие своеобразное успокаивающее действие, сопровождающееся уменьшением реакций на внешние стимулы, ослаблением психо-

моторного возбуждения и аффективной напряжённости, подавлением чувства страха, ослаблением агрессивности. От седативных средств нейролептики существенно отличаются наличием антипсихотической активности — способностью подавлять бред, галлюцинации, автоматизм и другие психопатологические синдромы у больных шизофренией и другими психическими заболеваниями.

Термин «нейролептики» в значительной мере связан с характерным для большинства данных препаратов симптомокомплексом побочных эффектов — нейролепсией, характеризующейся заторможенностью, экстрапирамидными расстройствами и ортостатическими реакциями. Степень выраженности нейролепсии снижена у ряда современных нейролептиков. Часто нейролептики классифицируют как антипсихотические средства («антипсихотики»).

Выраженным снотворным действием нейролептики в обычных дозах не обладают, но могут вызывать дремотное состояние и способствовать наступлению сна; они усиливают действие снотворных и других успокаивающих (седативных) средств, проявляют антигистаминную активность, потенцируют действие наркозных средств, наркотических анальгетиков («нейролептанальгезия»), ненаркотических анальгетиков, местных анестетиков и ослабляют эффекты психостимулирующих препаратов.

Молекулярный механизм антипсихотического действия нейролептиков связан с блокированием преимущественно дофаминовых и серотониновых подкорковых структур. При этом снижение передачи нервных импульсов в дофаминовых системах мезолимбической и мезокортикальной областей мозга является необходимым условием антипсихотического действия. Нежелательные экстрапирамидные побочные явления и повышение уровня пролактина в крови являются проявлением угнетения дофаминовых структур в экстрапирамидной системе и нарушения гипоталамо-гипофизарного взаимодействия. Снижение передачи импульсов в дофаминовых нейронах триггерной зоны и рвотного центра обеспечивает противорвотное действие, свойственное многим антипсихотикам.

Многим нейролептикам свойственна центральная и периферическая антиадренергическая активность, а некоторым — также холинолитическая, противогистаминная и противосеротониновая активности. Характерной особенностью ряда нейролептиков является их способность оказывать каталептогенное действие. Относительно редким опасным для жизни осложнением при длительной терапии является нейролептический синдром, требующий смены или отмены препарата.

Из нейрохимических механизмов действия нейролептиков наиболее изучено их влияние на процессы синаптической передачи нервных импульсов. Имеется много данных о влиянии нейролептиков на адренергетические, дофаминергические и холинергические процессы мозга.

Нейролептики угнетают катехоламинергические (адрено- и дофаминергические) системы гипоталамуса и ретикулярной формации мозга и понижают их чувствительность к нейромедиаторам. Олабление интенсивности катехоламинергических процессов мозга является одним из патогенетических элементов механизма действия нейролептиков, поскольку, по современным данным, ряд психопатологических процессов сопровождается изменением образования, накопления и обмена норадреналина и дофамина.

Антипсихотическая активность нейролептиков обусловлена преимущественно их влиянием на дофаминергические рецепторы лимбической системы мозга, а угнетение центральных адренергических рецепторов (в частности, в ретикулярной формации) обусловливает седативное действие, а также наблюдаемые в клинике гипотензивные эффекты.

С угнетением медиаторной активности дофамина связана не только антипсихотическая активность нейролептиков, но и вызываемый ими основной побочный эффект — экстрапирамидные расстройства, сходные с паркинсонизмом.

Нейролептики могут рассматриваться как антагонисты дофаминовых рецепторов мозга, о чём свидетельствуют данные радиорецепторных исследований, способность нейролептиков блокировать эффекты прямых (апоморфин) и непрямых (фенамин) агонистов дофаминовых рецепторов, каталептогенное действие нейролептиков, в основе которого лежит блокада дофаминовых рецепторов нигростриатной системы — предполагаемый нейрохимический механизм нейролептического экстрапирамидного синдрома.

Побочные экстрапирамидные эффекты полностью не коррелируют с антипсихотической активностью нейролептиков, что свидетельствует о неодинаковой чувствительности различных дофаминергических структур мозга к разным химическим соединениям. Поэтому усилия учёных направлены на получение нейролептиков с избирательным антипсихотическим действием без выраженных побочных экстрапирамидных эффектов.

В настоящее время создан ряд нейролептиков, влияющих преимущественно на серотониновые рецепторы. При их приёме отсутствуют или снижены экстрапирамидные расстройства. Ввиду малого сродства этих препаратов к дофаминовым рецепторам их называют атипичными нейролептиками. Данные об относительном сродстве атипичных нейролептиков в сравнении с «типичным» галоперидолом приведены в табл. 8.2.

Средняя терапевтическая доза типичного нейролептика (галоперидола) сопровождается блокированием 70–80% дофаминовых рецепторов базальных ганглиев мозга, что коррелирует с высокой степенью риска возникновения экстрапирамидных расстройств. В противоположность этому применение атипичных нейролептиков (клозапина) сопровождается преимущественным связыванием препарата с серотониновыми рецепторами типа 5-HT_2, чему соответствует низкая вероятность развития побочного экстрапирамидного эффекта.

Идеология поиска «идеального» нейролептика стала строиться на основе представления о необходимости сочетания в его фармакологическом и рецепторном профиле высокого сродства к дофаминовым рецепторам типа D_2 (по существу, к этому подсемейству относятся также подтипы D_3 и D_4, к которым атипичные нейролептики проявляют высокое сродство) и одновременно к серотониновым рецепторам 5-HT_2-типа. Исследования показали, что связывание с дофаминовым рецептором D_1-подтипа, широко представленным в области базальных ганглиев мозга, не является обязательным условием проявления антипсихотического действия; специально созданный селективный блокатор этого рецептора в клинике психозов оказался неэффективным.

Результатом развития нового направления явилось создание и введение в практику III поколения антипсихотических препаратов, к которым можно отнести рисперидон, раклоприд, ремоксиприд, оланзапин и кветиапин. Все они, как и их предшественники (клозапин и др.), могут быть с некоторыми оговорками отнесены к атипичным антипсихотическим препаратам. Высокая клиническая эффективность при лечении психозов для препаратов этой группы продемонстрирована достаточно убедительно. С позиций современного понимания механизмов действия этих веществ несомненный интерес представляет сравнительная характеристика их рецепторного профиля, т. е. сочетания аффинитета к тем или другим нейротрансмиттерным рецепторам мозга (см. табл. 8.2). С целью сравнения здесь же представлены рецепторные характеристики галоперидола. Для последнего, в отличие от атипичных нейролептиков, характерно очень высокое сродство к дофаминовым рецепторам типа D_2, включая все их разновидности, и относительно слабое сродство к серотониновым рецепторам типа 5-HT_2. Большое значение для психофармакологического профиля

Таблица 8.2

Характеристики рецепторного аффинитета атипичных нейролептиков и галоперидола (относительное сродство, отн. ед.)

Тип рецептора	Клозапин	Оланзапин	Ремоксиприд	Рисперидон	Галоперидол
Дофаминовый					
D_1	85	31	Нет	75	10
D_{2L}	60	11	125	1,5	0,5
D_{2S}	35	11	54	1,5	0,5
D_3	300	—	Нет	6,7	2,0
D_4	9	27	Нет	—	2,0
D_5	35	—	—	—	27
Серотониновый					
5-HT_{1A}	875	нет	Нет	16	Нет
5-HT_{2A}	8	5	Нет	0,6	74
5-HT_{2C}	12	23	Нет	16	Нет
5-HT_3	170	140	Нет	Нет	Нет
5-HT_6	4	2,5	Нет	425	Нет
5-HT_7	6,3	104	Нет	1,4	263
Холинергический					
M_1	1,8	1,9	Нет	Нет	Нет
M_2	21	18	Нет	Нет	Нет
M_3	13	25	Нет	Нет	Нет
M_4	12	13	Нет	Нет	Нет
M_5	3,7	—	Нет	Нет	Нет
Адренергический					
α_1	7	19	Нет	2	46
α_2	8	280	Нет	3	360
β_1	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Прочие					
Гистаминовый H_1	6	7	Нет	155	Нет
σ	Нет	—	60	—	5

галоперидола имеет, по-видимому, его способность связываться с адренорецепторами типа α_1, а возможно, и с «сигма»-участком рецепторно-канального комплекса глутаматного рецептора NMDA-типа. Рецепторный профиль рисперидона — нейролептика, получившего в последнее время большую известность, прямо противоположен профилю галоперидола; здесь обращает на себя внимание очень высокое сродство

к серотониновым рецепторам типа 5-HT_{2A} при сохранении практически такого же уровня активности по отношению к D_2-дофаминовым рецепторам.

Дальнейшие изыскания в области синтеза атипичных нейролептиков касались изучения механизма их действия и получения на этой основе новых соединений, обладающих принципиально новыми свойствами по сравнению с традиционными нейролептиками, механизм действия которых сводился к блокаде дофаминовых рецепторов типа D_2. При этом было установлено, что большинство атипичных нейролептиков по механизму действия подразделяются на две группы.

Первая группа препаратов, включающая клозапин, оланзапин и кветиапин, характеризуется взаимодействием с несколькими различными нейромедиаторными системами, в частности с дофаминовыми, серотониновыми, норадренергическими, холинергическими и гистаминовыми рецепторами.

Вторая группа препаратов, состоящая из рисперидона, амперозида, сертиндола и зипразидона, оказывает своё действие преимущественно за счёт влияния лишь на 2 типа рецепторов — дофаминовые и серотониновые. При этом способность блокировать серотониновые рецепторы у этих препаратов превосходит способность связываться с дофаминовыми рецепторами типа D_2.

Полагают, что именно это и объясняет наступление так называемого «антинегативного» эффекта и отсутствие или слабую выраженность побочных экстрапирамидных эффектов, поскольку между дофаминергическими и серотониновыми структурами в определённой мере существуют реципрокные отношения.

Все названные атипичные нейролептики к настоящему времени прошли исследования как в лабораторно-экспериментальных, так и клинических условиях, в которых в целом был подтверждён спектр антипсихотической активности этих соединений.

В последние годы благодаря разрешающим возможностям современных методов исследования (позитронная эмиссионная томография) сформировались новые представления о влиянии нейролептиков на дофаминовые рецепторы, согласно которым длительность блокады последних играет ведущую роль в механизме действия этих препаратов, превосходя по значению мощность и объём блокады. При этом чем короче блокада D_2-рецепторов, тем в большей степени эндогенный дофамин способен осуществлять свои физиологические функции (в том числе контроль когнитивных процессов) и, наоборот, чем длительнее блокада D_2-рецепторов, тем отчётливее дефицит дофамина и, следовательно, ослабления ряда функций, опосредуемых этим нейромедиатором. В соответствии с гипотезой «fast-off-D_2» (быстрым восстановлением функции D_2-рецепторов), к нейролептикам, характеризующимся быстрой диссоциацией от D_2-рецепторов, относятся амисульпирид, клозапин и кветиапин (атипичные антипсихотики), а медленной диссоциацией — такие типичные нейролептики, как галоперидол и хлорпромазин.

Рисперидон, оланзапин и кветиапин являются современными нейролептиками, обладающими психоэнергизующим действием и характеризующимися сниженными побочными эффектами. Важная особенность препаратов — терапевтическая эффективность при развитии резистентности к классическим нейролептикам. Их приём значительно легче переносится больными и способствует их социальной адаптации. Вместе с тем из-за выраженного антисеротонинового действия не рекомендуется приём указанных препаратов при наличии депрессивной симптоматики.

Характерным свойством ряда нейролептиков (производные бутирофенона и фенотиазина) является их способность ингибировать обратный захват ГАМК пресинаптическими нервными окончаниями мозга, что может играть определённую роль в реализации синаптического эффекта этих веществ.

Многочисленные биохимические исследования (в Институте фармакологии РАМН) показали, что нейролептики, прежде всего аминазин, оказывают сложное

влияние на многие стороны обмена в ЦНС. Ещё в ранних исследованиях было выявлено, что некоторые нейролептики изменяют потребление кислорода тканью мозга, что, видимо, обусловлено их влиянием на активность различных ферментов дыхательной цепи, в основном дегидрогеназ. В дальнейшем было установлено, что угнетение энергетического обмена ткани мозга при действии нейролептиков имеет сложную природу: возможно ингибирование транспорта электронов, разобщение дыхания и фосфорилирования и ингибирование переноса энергии. Кроме того, во многих работах обнаружено ингибирующее действие нейролептиков на активность мембранных АТФаз (в первую очередь, Na^+- и K^+-зависимых).

Эти эффекты, по-видимому, не являются специфическими, а обусловлены способностью нейролептиков взаимодействовать с биологическими мембранами и таким образом влиять на различные процессы клеточного метаболизма.

При длительном применении нейролептиков, как правило, развивается привыкание к ним, возможно развитие депрессии. Лекарственной зависимости не возникает, однако возможно развитие толерантности. Чрезвычайно важным является отсутствие у нейролептиков способности вызывать эйфорию, они являются препаратами первой линии для лечения наркоманий. Среди разнообразных побочных эффектов, возникающих при применении нейролептиков, можно отметить общую вялость, апатию, сонливость, сухость во рту, гипотонию, ортостатический коллапс, гинекомастию, остеопороз. Нередко наблюдаются диспепсические нарушения.

Эти свойства у разных нейролептиков выражены в разной степени, их сочетание с основным антипсихотическим эффектом определяет профиль действия и показания к применению в психиатрии и других областях медицины.

Создание новых антипсихотических средств стало возможным на основе изучения спектра их рецепторного взаимодействия с дофамино-, серотонино-, адрено- и гистаминергическими структурами ЦНС.

Современные представители атипичных нейролептиков, относящихся к III поколению (рисперидон, оланзапин, кветиапин и др.), отличаются высоким антипсихотическим действием, не уступающим галоперидолу, слабой выраженностью вплоть до отсутствия экстрапирамидной симптоматики, малой токсичностью [8].

Оланзапин — атипичный нейролептик, который блокирует дофаминовые (D_1, D_2, D_3, D_4), серотониновые (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) рецепторы, М-холинорецепторы (M_1, M_2, M_3, M_5), α-адренорецепторы и H_1-рецепторы.

Эффективность оланзапина в остром периоде изучена в ряде клинических испытаний, где его сравнивали с плацебо, типичными (галоперидол, хлорпромазин) и атипичными антипсихотиками. Плацебо-контролируемые исследования показали, что оланзапин уменьшает тяжесть психических нарушений, устраняет позитивные симптомы и повышает вероятность успеха терапии (определяемую, например, как снижение показателя тяжести психических нарушений на 20% и более). Однако данные о влиянии разных доз оланзапина на негативные симптомы не полностью согласуются между собой. Вероятно, уменьшение выраженности негативных симптомов объясняется действием оланзапина на вторичные негативные симптомы (например, обусловленные паркинсонизмом и психозом), а не прямым действием на первичные негативные симптомы. Оланзапин превосходил галоперидол по вероятности успеха терапии, улучшению показателя тяжести психических нарушений, уменьшению выраженности продуктивных и негативных симптомов.

Кветиапин блокирует дофаминовые (D_1, D_2), серотониновые (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) рецепторы, α_1- и α_2-адренорецепторы и H_1-рецепторы.

Эффективность кветиапина в остром периоде изучена в нескольких испытаниях, где его сравнивали с плацебо, типичными (галоперидол, перфеназин) и атипичными антипсихотиками. Все плацебо-контролируемые испытания показали, что кветиа-

пин уменьшает показатель тяжести психических нарушений, повышает вероятность успеха терапии (определяемого, например, как снижение показателя тяжести психических нарушений на 20% и более) и устраняет продуктивную симптоматику. Свидетельства о способности кветиапина устранять негативные симптомы не столь убедительны, так как данные об эффективности разных доз не полностью согласуются между собой. Вероятно, уменьшение выраженности негативных симптомов объясняется действием кветиапина на вторичные негативные симптомы (например, обусловленные паркинсонизмом и психозом), а не прямым действием на первичные негативные симптомы. Сравнительные испытания показали, что кветиапин не уступает, а в ряде случаев превосходит типичные нейролептики (галоперидол, хлорпромазин) по влиянию на показатели тяжести психических нарушений, продуктивную и негативную симптоматику, а также вероятность достижения терапевтического ответа. Мета-анализ этих испытаний показал примерно одинаковую эффективность кветиапина и типичных нейролептиков.

Новые мишени действия нейролептиков. Клозапин, как один из наиболее эффективных антипсихотических средств, проявляет антагонистическую активность в отношении дофаминовых D_2-рецепторов серотониновых 5-HT_{2A}-рецепторов и агонистическую активность в отношении дофаминовых D_1-рецепторов и мускариновых M_1- и M_4-рецепторов [9]. С помощью позитронной эмиссионной томографии было показано, что число мускариновых рецепторов заметно снижается при шизофрении, а частичные агонисты мускариновых M_1-рецепторов имеют выраженный антипсихотический эффект. Поэтому M_1-рецепторы могут быть мишенью действия будущих антипсихотичесх средств. Согласно данным эмиссионной томографии плотность дофаминовых D_1-рецепторов повышается при шизофрении. Известно, что агонисты D_1-рецепторов улучшают обучаемость у экспериментальных животных, но препаратов, которые бы избирательно действовали на D_1-рецепторы для клинического применения пока не разработано.

8.2. Анксиолитики

Анксиолитики (транквилизаторы, атарактики) устраняют состояние страха, тревоги, психической напряжённости. В отличие от нейролептиков они не обладают выраженными антипсихотическими свойствами.

История транквилизаторов ведёт начало с конца 1950-х годов, когда были синтезированы первые соединения с противотревожной активностью — мепробамат, гидроксизин, соединения бензодиазепинового ряда. Известно несколько сотен соединений, обладающих анксиолитическим действием. С середины 1970-х гг. формируется мнение о недопустимости бесконтрольного использования транквилизаторов в качестве седативных средств. Седативным и в некоторой степени анксиолитическим действием обладает ряд нейролептиков (так называемые «малые нейролептики») и антидепрессантов (флуоксетин), антигистаминных средств (димедрол, супрастин), используемых при терапии тревожной симптоматики психических расстройств и в качестве возможной альтернативы бензодиазепинам.

Нейрофизиологические исследования показали, что под влиянием транквилизаторов происходит уменьшение возбудимости подкорковых областей мозга (лимбической системы, таламуса и гипоталамуса), ответственных за осуществление эмоциональных реакций и торможение взаимодействия между этими структурами и корой мозга. Транквилизаторы оказывают также тормозящее влияние на полисинаптические спинальные рефлексы, вызывая этим миорелаксацию.

В нейрохимическом аспекте транквилизаторы менее эффективны, чем нейролептики. Пропандиолы не влияют на медиаторы нервного возбуждения. Бензодиазепины умеренно тормозят образование и действие дофамина и норадреналина в структурах мозга.

Установлено, что бензодиазепины усиливают процессы торможения в системах головного мозга, где нейромедиатором является γ-аминомасляная кислота (ГАМК).

ГАМК — основной тормозной нейропередатчик в ЦНС — синтезируется при декарбоксилировании глутамата. ГАМК действует на две основные группы молекулярных рецепторов — ионотропные рецепторы типа $ГАМК_А/ГАМК_С$ и метаботропные рецепторы типа $ГАМК_В$. $ГАМК_А$-рецептор представляет собой канал для ионов хлора. При его активации ионы хлора входят в нейрон и повышают порог возбудимости плазматической мембраны, снижая активность межнейронной передачи и возбудимость ЦНС в целом. Бензодиазепины усиливают действие ГАМК на $ГАМК_А$-рецептор, что и обусловливает их транквилизирующий эффект. $ГАМК_А$-рецепторы у млекопитающих состоят как минимум из 16 субъединиц, которые сгруппированы в семь классов. Комбинации этих субъединиц обусловливают существование множества изоформ рецепторов, причём композиция субъединиц определяет специфичность эффектов аллостерических модуляторов $ГАМК_А$-рецепторов (таких, как нейростероиды, цинк, бензодиазепины и барбитураты). Композиция субъединиц также определяет кинетику активации рецепторов и может оказывать влияние на их десенситизацию. Композиция субъединиц $ГАМК_А$-рецепторов в нейронах может меняться во время эпилептогенеза.

Канал $ГАМК_А$-рецептора проницаем для ионов хлора и в некоторой степени для бикарбонат-иона. В нервной системе активация $ГАМК_А$-рецепторов, как правило, приводит к входу Cl^- в нейрон и к гиперполяризации клетки. Необходимый градиент ионов хлора поддерживается калий/хлорным котранспортёром, который начинает «выкачивать» Cl^- наружу после прекращения стимуляции рецептора.

В $ГАМК_А$-рецепторе существуют целый ряд модулирующих участков, отличных от участка связывания ГАМК. Вещества, воздействующие на данные участки, повышают или, наоборот, снижают эффективность активации $ГАМК_А$-рецепторов агонистом. Одним из таких участков аллостерических модуляторов является бензодиазепиновый рецептор. Этот рецептор представляет собой мишень для антиконвульсантов, барбитуратов и бензодиазепинов. Активация бензодиазепинового рецептора ведёт к увеличению сродства γ-аминомасляной кислоты к $ГАМК_А$-рецептору. Различия ГАМК-рецепторов по их чувствительности к бензодиазепинам могут быть объяснены неодинаковым составом входящих в данные рецепторы субъединиц. Другим участком аллостерической модуляции ГАМКА-рецепторов является сайт связывания барбитуратов. $ГАМК_А$-рецепторы, чувствительные к барбитуратам, более широко распространены в мозгу, чем $ГАМК_А$-рецепторы, чувствительные к бензодиазепинам.

Помимо соединений, обладающих всеми характерными для современных транквилизаторов фармакологическими и лечебными свойствами, получен ряд веществ, оказывающих транквилизирующий эффект, но отличающихся по действию от «классических» транквилизаторов. Эти вещества обычно обозначают как «дневные» транквилизаторы. По силе транквилизирующего действия они уступают, например, феназепаму, но оказывают меньшее седативное действие и в терапевтических дозах не вызывают выраженной миорелаксации. У них слабо выражено или отсутствует противосудорожное действие. Они меньше нарушают работоспособность, их можно шире назначать в дневные (рабочие) часы, препараты способны улучшать настроение у депрессивных больных. К «дневным» транквилизаторам относятся соединения различных химических групп — мебикар, бензодиазепины, мезапам и грандаксин.

Новой отечественной разработкой является небензодиазепиновый транквилизатор афобазол, разработанный в НИИ фармакологии РАМН им. В.В. Закусова и выпускаемый ЗАО «Мастерлек», который также влияет на функционирование $ГАМК_А$-рецептора [10–12]. К нему не формируется выраженного привыкания. Афобазол по химической структуре относится к производным меркаптобензимидазола. У него не обнаружено свойств агониста бензодиазепиновых рецепторов. Действие препарата основано на торможении мембранозависимых изменений в ГАМК-рецепторе, в связи с чем снижается его доступность для соответствующего лиганда. Афобазол относится к «короткоживущим» препаратам, период его полувыведения составляет $0{,}82 \pm 0{,}54$ ч, время достижения максимальной концентрации — $0{,}85 \pm 0{,}13$ ч, а удержание препарата в организме — в среднем $1{,}6 \pm 0{,}86$ ч. В доклинических исследованиях афобазола на животных доказаны его анксиолитическое действие и отсутствие седативного эффекта.

Выполнен радиолигандный анализ взаимодействия афобазола {5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазола дигидрохлорид} и его основного метаболита М-11 {2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид} с нейрорецепторами. Установлено взаимодействие афобазола с σ_1-рецепторами ($K_i = 5{,}9 \cdot 10^{-6}$ М), мелатониновыми $МТ_1$ ($K_i = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$ М), $МТ_3$ ($K_i = 9{,}7 \cdot 10^{-7}$ М) рецепторами, регуляторным участком МАО-А ($K_i = 3{,}6 \cdot 10^{-6}$ М). Выявлены лигандные свойства М-11 по отношению к $МТ_3$-рецепторам ($K_i = 3{,}9 \cdot 10^{-7}$ М). Методом конфокальной микроскопии показана транслокация σ-рецептора из эндоплазматического ретикулума в область наружной мембраны на модели иммортализированных клеток гиппокампа НТ-22 после 30 и 60 мин инкубации с афобазолом в концентрации 10^{-6} М. Установлено, что афобазол является обратимым ингибитором МАО-А. Полученные данные соответствуют ранее зарегистрированным анксиолитическим и нейропротекторным свойствам афобазола.

Проведено фармакологическое изучение нейропротекторных свойств афобазола в опытах *in vitro* и *in vivo* с использованием моделей ишемического и геморрагического инсульта. Установлены межлинейные различия в изменении в ответ на стресс уровня мозгового нейротрофического фактора BDNF у животных с различным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции. Показано, что афобазол (5 мг/кг) препятствует снижению уровня BDNF, причём его эффект более выражен у животных с генетически детерминированной реакцией страха. В данной серии экспериментов получены подтверждения гипотезы о сочетании анксиолитических и нейропротекторных свойств афобазола. Нейропротекторный эффект афобазола доказан на моделях оксидативного стресса и глуматной токсичности на культуре клеток.

Нейропротекторный эффект афобазола подтверждён на моделях ишемического и геморрагического инсульта в широком диапазоне доз. Определены оптимальные режимы введения, в том числе эффективность при первом применении в пределах терапевтического окна.

Доказано, что афобазол вызывает значительное увеличение мозгового кровотока у крыс, перенёсших глобальную преходящую ишемию мозга, и повышает выживаемость животных в условиях ишемии, вызванной окклюзией общих сонных артерий.

При сравнительных клинических испытаниях афобазола и диазепама у пациентов с тревожными расстройствами выявлено постепенное развитие клинического эффекта и лучшая переносимость афобазола. Данный препарат может иметь преимущество перед бензодиазепинами при хроническом приёме. Особенностями действия афобазола являются постепенное развитие анксиолитического эффекта с преимущественным влиянием на когнитивную составляющую тревоги, хорошая переносимость, отсутствие синдрома отмены при резком прекращении приёма препарата. Появление нового анксиолитика с таким благоприятным для клинической практи-

ки сектором психофармакологической активности свидетельствует о перспективах его применения при генерализованной тревоге в широкой амбулаторной практике (в том числе неврологической и общесоматической) у гериатрических пациентов, у лиц, находящихся в стрессовой ситуации. Следует отметить, что афобазол — это селективный анксиолитик, который не имеет мировых аналогов. Принципиально отличается от бензодиазепиновых транквилизаторов отсутствием седации, миорелаксации, расстройств памяти, зависимости и синдрома отмены. Афобазол обладает нейропротективными свойствами, что делает его перспективным для применения при широком спектре психических и неврологических заболеваний.

8.3. Антидепрессанты

Антидепрессанты применяются при депрессивных состояниях, которые характеризуются апатией, тоскливым настроением, психической и двигательной заторможенностью. Нарушается умственная и физическая работоспособность, тяжёлая степень психической депрессии может приводить к суицидальным попыткам, что и определяет социальную значимость данной патологии. Антидепрессивные средства, восстанавливающие настроение, психическую и двигательную активность, первоначально назывались тимоаналептиками.

Препараты для лечения депрессий оказывают влияние на концентрацию ряда нейромедиаторов, а также их рецепторов в головном мозге, различия в их взаимодействии с медиаторными системами определяют эффективность фармакотерапии и её побочные эффекты.

В настоящее время установлены три основных механизма действия антидепрессантов — влияние на обратный захват моноаминов (норадреналина, дофамина и серотонина), ингибирование МАО (моноаминооксидаз, окисляющих норадреналин и дофамин) и прямое взаимодействие с рецепторами катехоламинов и серотонина.

К «типичным» антидепрессантам относятся препараты, изменяющие концентрацию нейромедиаторов (например, ингибиторы МАО и обратного захвата серотонина), к «атипичным» — преимущественно соединения рецепторного действия, мало влияющие или не влияющие на уровень норадреналина и серотонина в ЦНС.

Существует ряд гипотез патогенеза депрессивных состояний. Длительное время признавалась так называемая катехоламиновая гипотеза депрессий, связывающая их проявления с дефицитом норадреналина и дофамина в ЦНС. Основой фармакологических поисков в соответствии с ней являлось получение веществ, способных повышать концентрацию норадреналина (НА) в ЦНС, блокируя обратный захват НА либо ингибируя его метаболизм с участием МАО. Однако нет прямых доказательств, что сдвиги метаболизма катехоламинов отражают изменения настроения и поведения, характерные для больных депрессиями.

Широкое распространение получила гипотеза о роли нарушений обмена серотонина в генезе депрессивных состояний (индоламинергическая теория депрессий). У некоторых больных было выявлено снижение уровня метаболита серотонина — 5-оксииндолуксусной кислоты в ликворе. Серотонинергический компонент действия антидепрессантов привлёк особое внимание после работ, выявивших ингибирующее действие ряда препаратов на обратный захват серотонина нервными окончаниями. Однако при попытках выявить закономерности между степенью ингибирования захвата и терапевтическим эффектом не было найдено корреляции. В организме трициклические антидепрессанты — третичные амины, обладающие выраженным угнетающим влиянием на захват серотонина, образуют метаболиты, тормозящие захват НА. Отдельные препараты из группы «атипичных» антидепрессантов не влияют на процессы обратного захвата нейромедиаторов.

Данные об изменении суточных ритмов колебания плотности ряда мембранных рецепторов (адренергических, холинергических, дофаминергических, опиоидных, бензодиазепиновых) и секреции мелатонина при депрессии, позволили сформулировать циркадную теорию депрессивных состояний. Применение антидепрессантов способствует нормализации биоритма содержания мелатонина, нарушение которого может быть причиной депрессии. Введение этого гормона эпифиза модулирует эффект антидепрессантов. Данная гипотеза продолжает развиваться.

В последние годы большое внимание уделяется постсинаптическим эффектам антидепрессантов. Наиболее общим свойством всех препаратов этой группы является снижение активности НА-зависимой аденилатциклазы при их хроническом введении. Не только фармакологические вещества, но и другие терапевтические приёмы (электросудорожная терапия) сопровождаются снижением чувствительности этой ферментной системы. Параллельно с изменением реакции аденилатциклазы снижается и число β-адренорецепторов. Временные параметры адаптивных перестроек рецепторного аппарата совпадают со сроками развития терапевтического эффекта. Понижающая регуляция β-адренорецепторов приводит к повышению активности α-адренергических нейронов и стимуляции ЦНС. Содержание β-адренорецепторов в головном мозге пропорционально их количеству на тромбоцитах. Уменьшение числа этих рецепторов на тромбоцитах может служить одним из критериев оценки эффективности антидепрессантов. Сравнительная рецепторная активность антидепрессантов и их способность блокировать обратный захват биогенных аминов представлены в табл. 8.3. Данные о наличии постсинаптических эффектов у этих препаратов послужили основой для гипотезы адаптационных перестроек рецепторного аппарата нервных клеток путём изменения количества мест связывания лигандов и влияния на внутриклеточные механизмы трансформации химического сигнала. Действие антидепрессантов может быть прямым («атипичные» антидепрессанты) или опосредованным изменением концентрации медиатора (норадреналина, серотонина и др.) (ингибиторы МАО, имипраминоподобные препараты).

Эта гипотеза в настоящее время является признанной и на её основе ведётся поиск новых препаратов.

Классификация современных антидепрессантов (по К. С. Раевскому, с модификациями) включает следующие группы.

1. Трициклические антидепрессанты (ТЦА) и родственные им соединения.

Представители — амитриптилин, имипрамин, дезипрамин, кломипрамин, пипофезин (азафен) пиразидол, доксепин, тримипрамин.

Механизм действия — неселективное угнетение обратного захвата норадреналина (НА) и серотонина (5-НТ) нервными окончаниями головного мозга.

2. Ингибиторы моноаминоксидазы (ИМАО):

а) неселективные — ниаламид, фенелзин, транилципромин;

б) селективные ингибиторы МАО типа А — моклобемид, пиразидол, метралиндол.

3. Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС).

Представители — флуоксетин, флувоксамин, пароксетин, сертралин, циталопрам, эсциталопрам, кломипрамин, тразодон.

Механизм действия — избирательное угнетение обратного захвата серотонина нервными окончаниями.

4. Селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина и серотонина (СИОЗСиН).

Представители — венлафаксин, милнаципран, дулоксетин.

Механизм действия — избирательное угнетение обратного захвата НА и серотонина нервными окончаниями.

Таблица 8.3

Сравнительная рецепторная активность современных антидепрессантов, отн. ед.

Препарат	Характер воздействия									
	Блокада обратного захвата			Блокада рецепторов						
	норадреналина	серотонина	дофамина	H_1	M_1	α_1	α_2	D_2	$5HT_2$	$5HT_3$
Амитриптилин	3	3	4	2	1	1	2	4	3	3
Амоксапин	2	4	4	3	4	2	4	1	1	?
Бупропион	5	6	3	5	6	5	6	6	6	?
Дезипрамин	1	4	5	4	3	3	5	4	5	5
Доксепин	3	4	5	1	2	1	3	4	3	7
Имипрамин	3	3	4	3	2	2	4	4	4	4
Кломипрамин	3	2	4	3	2	2	5	2	4	1
Мапротилин	2	6	4	2	4	2	5	4	4	7
Миансерин	4	5	5	2	4	2	1	4	2	3
Нортриптилин	2	4	4	3	2	2	4	4	3	4
Пароксетин	4	1	4	6	3	5	5	4	6	2
Сертралин	5	2	3	6	5	4	4	5	6	1
Тримипрамин	4	5	4	1	2	1	3	3	3	7
Тразодон	5	4	6	4	5	1	1	4	2	7
Флувоксамин	5	2	4	6	6	5	5	6	6	7
Флуоксетин	4	2	4	5	5	5	5	6	5	2
Циталопрам	6	2	6	4	5	4	6	6	6	7

Не включены ингибиторы МАО.

5. Селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина (СИОЗН) (ребоксетин).

6. Антидепрессанты с рецепторным механизмом действия («атипичные») — норадренергические и специфические серотонинергические антидепрессанты (НаССА).

Взаимодействуют непосредственно с рецепторами норадреналина и серотонина, не влияя на концентрацию этих медиаторов.

7. Селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина и дофамина (СИОЗНиД).

В обобщённом виде фармакологические различных классов антидепрессантов представлены в табл. 8.3.

Основные представители «типичных» трициклических антидепрессантов имизин (имипрамин) и амитриптилин не влияют на активность МАО, тормозят обратный нейрональный захват преимущественно серотонина путём взаимодействия с имипраминовыми рецепторами пресинаптической мембраны серотонинергических нейронов. Имипраминовый рецептор представляет собой трансмембранный белок — переносчик серотонина. Предполагается, что эндогенными лигандами имипраминовых рецепто-

ров являются серотонин и соединения из группы пиримидинов (тимидин, уридин), способные вытеснять имипрамин из специфических связывающих участков.

При некоторых формах депрессивных состояний наблюдается снижение числа имипраминовых рецепторов тромбоцитов, которое нормализуется в процессе лечения и может служить критерием эффективности терапии. Имизин снижает число, но не аффинность β-адренорецепторов, что приводит к повышению активности адренергических структур ЦНС и к психоэнергизующему эффекту. Препарат блокирует М-холинорецепторы, в связи с чем возможны сухость во рту вплоть до образования трещин и эрозий слизистой, нарушение аккомодации, задержка мочеиспускания. Наряду с уменьшением депрессии и повышением активности могут усиливаться бред и галлюцинации. Наблюдаются кожные аллергические реакции, нарушения сердечного ритма. При передозировке возможны бессонница и возбуждение.

Также к типичным трициклическим антидепрессантам относится амитриптилин, блокирующий обратный захват серотонина. Антидепрессивный эффект сочетается с седативным влиянием. Побочные эффекты связаны с его холинолитическими свойствами — сухость во рту, запоры. Имизин и амитриптилин нельзя сочетать с неселективными ингибиторами МАО, они противопоказаны при глаукоме. Типичный трициклический антидепрессант азафен лишён холинолитической активности и не вызывает галлюцинаций.

Механизм действия коаксила — антидепрессанта из группы трициклических производных — связывают с повышением обратного нейронального захвата серотонина нейронами коры головного мозга и гиппокампа. Коаксил повышает спонтанную активность пирамидальных клеток и увеличивает скорость их восстановления после функционального подавления. По характеру действия на нарушения настроения коаксил занимает промежуточное положение между седативными и стимулирующими антидепрессантами.

Ряд четырёхциклических антидепрессантов (пиразидол, инказан) сочетает торможение обратного захвата нейромедиаторов с ингибированием МАО. Угнетение МАО носит обратимый характер, а холинолитического действия эти препараты не оказывают. Их нельзя сочетать с ингибиторами МАО и симпатомиметиками. Ввиду отсутствия холинолитического действия они могут применяться при глаукоме. К препаратам, не влияющим на обратный захват нейромедиаторов, относятся атипичные трициклические антидепрессанты (иприндол) и некоторые из четырёхциклических соединений (мапротилин, миансерин). Это препараты относительно мягкого действия, используемые для лечения депрессий лёгкой и средней тяжести, их механизм действия связан с прямым блокированием НА-зависимой аденилатциклазы.

Наряду с трициклическими (классическими) антидепрессантами в настоящее время широкое применение находят и другие препараты разного химического строения.

Для антидепрессантов разных групп, отличающихся по химической структуре, характерна различная степень селективности сродства к мембранным транспортёрам моноаминов — норадреналина, дофамина, серотонина, а также к отдельным рецепторам. Группа классических трициклических антидепрессантов отличается значительной неоднородностью сродства к отдельным моноаминовым транспортёрам. Так, имипрамин, обладая практически одинаковым аффинитетом к переносчикам 5-НТ и норадреналина, проявляет значительно меньшее сродство к системе захвата дофамина.

Следует отметить, что несмотря на появление большого числа новых препаратов с более избирательным действием на обратный захват норадреналина/серотонина, классические антидепрессанты имипрамин и амитриптилин по-прежнему широко используются в лечении депрессивных состояний, представляя собой своего рода «золотой стандарт».

Главным отличием «классических» трициклических антидепрессантов (ТЦА) является относительно широкий нейрохимический профиль, т. е. способность воздействовать не только на захват моноаминов, но и на центральные и периферические холинорецепторы мускаринового типа, β-адрено- и гистаминовые рецепторы. С этим свойством связано большинство побочных эффектов антидепрессантов (седативный эффект, ортостатическая гипотензия, аритмогенное действие, кардиотоксичность, нарушение аккомодации, дизурические расстройства и др.). Антидепрессанты II поколения, к числу которых относятся селективные ингибиторы захвата моноаминов, обладают более узким нейрохимическим профилем, не проявляют аффинитета к большинству рецепторов и в связи с этим лучше переносятся, у них меньше выражены отмеченные выше побочные эффекты. Вместе с тем, как показали широкие клинические исследования, новые антидепрессанты по терапевтической эффективности, как правило, не превосходят своих классических предшественников первой генерации.

Другой мишенью действия ряда антидепрессантов является моноаминоксидаза. Существуют 2 типа моноаминоксидаз (МАО) — А и Б. Субстраты, окисляемые МАО типа А, — норадреналин, серотонин, а для МАО типа Б — фенилэтиламин. Оба типа фермента окисляют тирамин. Для развития антидепрессивного эффекта необходима блокада МАО типа А. Ингибиторы МАО могут усиливать эффекты сосудосуживающих моноаминов (тирамина, фенилэтиламина), содержащихся в некоторых пищевых продуктах (сыр, сливки, кофе, пиво, вино). В обычных условиях эти амины разлагаются под влиянием МАО, содержащейся в тонком кишечнике и печени. При угнетении активности фермента может проявляться сосудосуживающее действие этих соединений. В клинике используются селективные (блокаторы МАО типа А) и неселективные (угнетающие оба вида фермента) ингибиторы МАО.

Первым препаратом из группы неселективных ингибиторов МАО было производное гидразина ниаламид. Он имел ограниченное применение для лечения депрессивных состояний, сочетающихся с заторможенностью, при невралгиях и других болевых синдромах. Побочные эффекты — беспокойство, головная боль, сухость во рту, гипотония. Наиболее выраженным побочным эффектом у неселективных ингибиторов МАО является так называемый «сырный синдром» — адреномиметические эффекты, возникающие при употреблении пищевых продуктов, содержащих тирамин (сыр, бананы, кофе) — повышение артериального давления, аритмия и обострение симптомов ишемической болезни сердца. Использование противотуберкулёзных средств — производных гидразина также может приводить к развитию отдельных проявлений сырного синдрома.

К более современным препаратам этой группы относятся фенелзин и транилципромин (производные амфетамина). Антидепрессивный эффект развивается несколько быстрее, чем при использовании ниаламида. «Сырный синдром» при их использовании несколько менее выражен, однако их не рекомендуется сочетать с адреномиметическими средствами. Неселективные ингибиторы МАО, угнетая ферментные системы печени, участвующие в метаболизме лекарственных веществ, удлиняют и усиливают действие многих препаратов (барбитуратов, транквилизаторов, гипотензивных средств), а также алкоголя. Вследствие этого во избежание непредвиденного патологического опьянения следует предупреждать больных о невозможности приёма алкоголя. Ниаламид и другие неселективные ингибиторы МАО не следует назначать одновременно с трициклическими антидепрессантами, которые увеличивают выход катехоламинов из нервных окончаний; необходима диета с исключением тираминсодержащих продуктов.

Более перспективными являются обратимые селективные ингибиторы МАО типа А, например моклобемид и родственное ему средство бефол. Они обладают пси-

хоэнергизующим действием, способностью купировать расстройства, резистентные к предшествующему лечению, не обладают холинолитическими и кардиотоксическими свойствами, не усиливают действие прессорных аминов пищи. Могут сочетаться с нейролептиками, транквилизаторами и трициклическими антидепрессантами. Их достоинствами является быстрота наступления терапевтического эффекта (на 2-й–3-й день), возможность в связи с небольшими побочными эффектами использовать у пожилых и ослабленных больных, а также амбулаторно. Способностью избирательно блокировать МАО типа А обладает четырёхциклический антидепрессант пиразидол. Этот препарат также блокирует обратный захват норадреналина и других моноаминов. Следует учитывать, что селективность ингибирования МАО относительна и зависит от дозы, поэтому следует с осторожностью назначать данные препараты пациентам с ИБС и гипертонической болезнью.

Все ингибиторы МАО (селективные и неселективные) нельзя применять в сочетании с симпатомиметическими веществами (адреналин, эфедрин, фенамин).

Антидепрессанты, относящиеся к селективным ингибиторам обратного захвата серотонина (СИОЗС), используются в терапии депрессивных расстройств наиболее широко. Не уступая по эффективности трициклическим антидепрессантам или превосходя их, СИОЗС предпочтительнее по безопасности и отсутствию побочных эффектов. Номенклатура препаратов этого типа действия постоянно увеличивается. Наибольший клинический опыт накоплен при использовании флуоксетина. Несколько позже в практику были введены флувоксамин, пароксетин, циталопрам, эсциталопрам, сертралин.

Основным преимуществом указанных препаратов является значительно сниженное холинолитическое действие, что позволяет применять их у более широкого контингента больных. Своё название СИОЗС получили из-за большей селективности в отношении блокирования обратного захвата серотонина, чем обратного захвата норадреналина (по меньшей мере в 10 раз). Кроме того, СИОЗС имеют незначительное сродство к α_1-адренорецепторам, М-холинорецепторам, гистаминовым H_1-рецепторам, что обеспечивает их хорошую переносимость. СИОЗС, в отличие от ТЦА, не обладают способностью к блокированию медленных натриевых каналов, в связи с чем они более безопасны при передозировке.

Препараты группы СИОЗС обладают не только антидепрессивным, но и противотревожным (анксиолитическим) действием. Поэтому они эффективны при наличии у больных депрессией сопутствующей тревожной симптоматики, панических атак, фобических синдромов.

Общим в их молекулярном механизме действия является способность взаимодействовать с пресинаптическими рецепторами серотонина. На 80–95% эти соединения связываются с белками крови, что обусловливает относительно длительное их нахождение в организме. Циталопрам, сертралин на 7–10 дней раньше вызывают наступление клинического улучшения и на 15–25% превосходят флуоксетин.

Побочные эффекты СИОЗС проявляются ажитацией, акатизией, тревогой, инсомнией (чрезмерная стимуляция 5-HT_2-рецепторов) и тошнотой, неприятными ощущениями в желудке, диареей, головной болью (чрезмерная стимуляция 5-HT_3-рецепторов). Незначительная холинолитическая активность отмечается у 40–60% пациентов. Наиболее опасным, хотя и редким побочным эффектом является развитие серотонинового синдрома при использовании СИОЗС, особенно в случае сочетания их с ингибиторами МАО.

Селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина и серотонина (СИОЗСиН) представлены такими препаратами, как венлафаксин, милнаципран, дулоксетин. Их механизм действия заключается в избирательном угнетении обратного захвата норадреналина и серотонина нервными окончаниями.

Результаты сравнительных исследований СИОЗС и ТЦА показали, что в ряде случаев трициклические антидепрессанты (амитриптилин и кломипрамин) превосходят селективные ингибиторы обратного захвата серотонина по клинической эффективности при лечении тяжёлых депрессивных состояний. Сочетанное применение трициклического и СИОЗС антидепрессантов вызывало более выраженный лечебный эффект, чем изолированное использование СИОЗС (флуоксетина).

Венлафаксин является наиболее изученным препаратом данной группы. Взаимодействует с адрено- и серотониновыми рецепторами. Он по рецепторному профилю близок к ТЦА (амитриптилину), однако имеет значительно сниженную холинолитическую активность. Венлафаксин быстрее других антидепрессантов снижает концентрацию β-адренорецепторов, что способствует ускорению начала лечебного эффекта. В ряде плацебо-контролируемых исследований он показал более высокую эффективность, чем ТЦА, и более быстрое наступление клинического улучшения, чем СИОЗС.

Дулоксетин — сбалансированный и мощный ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина. Сбалансированность означает приблизительно одинаковое взаимодействие с транспортными субъединицами, осуществляющими обратный захват указанных медиаторов. Препарат относится к числу антидепрессантов с наиболее сильным сродством (аффинитетом) к транспортным субъединицам серотонина и норадреналина.

По величине аффинитета к транспортным системам, оцениваемым *in vitro* в виде концентрации ЛВ, требующейся для ингибирования 50% от максимума мест связывания, определяемых радиолигандным методом, дулоксетин в 3 раза превосходит венлафаксин.

Восстановление с помощью дулоксетина баланса между серотонинергической и норадренергической медиацией играет важнейшую роль в лечении депрессии и боли с учётом роли дисбаланса этих медиаторов в формировании эмоциональных и болевых расстройств. Дулоксетин не обладает эффектом в отношении блокады обратного захвата дофамина и не вступает во взаимодействие с холинергическими и гистаминергическими рецепторами.

Дулоксетин повышает активность поперечно-полосатой мускулатуры. Он эффективен для лечения женщин со стрессовым и смешанным типами недержания мочи. Кроме того, его можно применять при лечении мужского стрессового недержания мочи (SUI) после радикальной простатэктомии или цистэктомии. Начальная доза дулоксетина, как правило, равна терапевтической и составляет 60 мг/сут (однократный приём).

Характерное свойство селективных ингибиторов обратного захвата норадреналина (СИОЗН) — выраженное стимулирующее действие при отсутствии или малой выраженности седативного действия.

К антидепрессантам с рецепторным механизмом действия («атипичным») относятся норадренергические и специфические серотонинергические антидепрессанты (НаССА). Миансерин и миртазапин — 4-циклические соединения, по структуре напоминающие пиразидол. Они блокируют α_2-адренорецепторы, локализованные на пресинаптических окончаниях адрено- и серотонинергических нейронов. Рецепторы этого типа осуществляют тормозной контроль высвобождения норадреналина и серотонина, а их блокада ведёт к усилению нейропередачи в соответствующих синапсах. В опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что миансерин вызывает увеличение пресинаптического выброса норадреналина и устраняет эффект клонидина, агониста α_2-адренорецепторов. Кроме того, препарат угнетает постсинаптические 5-HT_2 серотониновые рецепторы. Характерные побочные эффекты миансерина, такие как

ортостатическая гипотензия и седативное действие, связывают с влиянием препарата на α_1- и H_1-гистаминовые рецепторы мозга.

Миртазапин блокирует пресинаптические α_2-адренорецепторы, угнетающие высвобождение серотонина, в результате чего серотонинергическая нейропередача изменяется. Он также блокирует постсинаптические 5-HT_2- и 5-HT_3-рецепторы, что ведёт к модуляции серотонинергической нейропередачи.

Препараты этой группы проявляют анксиолитическое и снотворное действие. Они наиболее эффективны при тревожных депрессиях. Антидепрессивный эффект развивается постепенно, через 1–2 недели лечения.

Ввиду блокирования 5-HT_3-серотониновых рецепторов, со стимуляцией которых связывают появление тошноты и рвоты при химиотерапии злокачественных опухолей, препараты группы НаССА очень хорошо подходят для терапии депрессий у онкологических больных, получающих химиотерапию. Помимо собственно антидепрессивного эффекта, они уменьшают тошноту и рвоту при проведении химиотерапии.

Благодаря блокированию 5-HT_2- и 5-HT_3-серотониновых рецепторов препараты группы НаССА склонны повышать либидо, улучшать качество оргазма, оказывать растормаживающее влияние на сексуальную активность больных. К сожалению, препараты группы НаССА также не лишены побочных эффектов, связанных с сильной антигистаминной активностью: они обладают выраженной (иногда чрезмерной) седативной активностью, сильно повышают аппетит, склонны давать значительную прибавку массы тела. Иногда наблюдаются яркие цветные сны и даже кошмары, нарушение фазовой структуры сна. Вследствие блокады α_2-адренорецепторов поджелудочной железы наблюдается значительное повышение секреции инсулина, могущее приводить не только к повышению аппетита и прибавке массы тела, но и к развитию гипогликемических состояний, особенно у больных диабетом II типа.

Как и другие антидепрессанты, препараты группы НаССА могут проявлять слабое холинолитическое действие, не рекомендуется их сочетание с ингибиторами МАО.

При приёме внутрь препараты группы НаССА быстро абсорбируются из ЖКТ, биодоступность составляет 20–50% из-за эффекта «первого прохождения» через биохимически активные ткани (слизистые оболочки кишечника, печень). Концентрация C_{max} достигается через 2–4 ч и составляет 6–19 нг/мл плазмы. Равновесная концентрация в крови при ежедневном приёме достигается через 6 дней; связывание с белками плазмы 80–96%; метаболизируются в печени путём деметилирования и окисления с последующей конъюгацией метаболитов, $t_{1/2}$ 21–61 ч (в среднем 32 ч). Выводятся (частично в виде метаболитов) на 70% почками и на 8–28% кишечником.

Селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина и дофамина (СИОЗНиД) — это современная группа антидепрессантов с минимальными побочными эффектами и хорошей переносимостью. Единственным известным сегодня представителем этого класса антидепрессантов является бупропион. Его отличительные особенности — малая вероятность инверсии знака фазы в манию или гипоманию и малая вероятность провокации «быстрого цикла» — меньшая, чем у СИОЗС, и гораздо меньшая, чем у ТЦА или ИМАО и других мощных антидепрессантов. В связи с этим бупропион особенно рекомендуется больным с биполярной депрессией, склонным к инверсии фазы или развитию «быстрого цикла» при лечении различными антидепрессантами. Бупропион обладает способностью уменьшать потребность в никотине и тягу к нему, а также физические и психические проявления никотиновой абстиненции. В связи с этим под названием Зибан он специально предложен для облегчения отвыкания от курения табака. Важными особенностями бупропиона являются также выраженное общее стимулирующее и психоэнергизирующее действие (настолько выраженное, что рядом специалистов он ранее классифицировался не как антидепрессант,

а как психостимулятор, несмотря на отсутствие наркотических свойств), а также растормаживающее действие на либидо, сексуальную активность и качество оргазма. В связи с растормаживающим действием на либидо бупропион часто применяется как корректор сексуальных побочных эффектов ТЦА, СИОЗС или СИОЗСиН.

Клинические исследования показали, что у больных с депрессиями нарушена отрицательная обратная связь оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники, осуществляемая при участии глюкокортикоидных рецепторов, а лечение антидепрессантами её восстанавливает [13]. В условиях *in vitro* была выявлена способность антидепрессантов модулировать экспрессию иРНК глюкокортикоидных рецепторов, уровень этих рецепторов и их функцию. Поэтому изучение действия антидепрессантов на функцию глюкокортикоидов может дать новую информацию о терапевтическом действии этой группы психотропных средств.

8.4. Психостимулирующие средства

Вещества, которые способны улучшать психическую деятельность как здоровых, так и больных людей известны под названием психостимуляторов.

Принципиальным различием в механизмах действия этих средств является влияние на нейромедиаторные системы ЦНС. Препараты, повышающие концентрацию нейромедиаторов (в первую очередь норадреналина и дофамина), — психомоторные стимуляторы, оказывают более выраженное стимулирующее действие на физическую и частично умственную работоспособность, способны устранять усталость, сон, голод и жажду. Эти средства часто являются предметом злоупотребления и причиной развития наркоманий. Их номенклатура и применение в медицине ограничены, хотя наркотики этого типа чрезвычайно распространены и представляют собой серьёзнейшую медико-социальную проблему.

Другой, гораздо более обширной группой являются стимуляторы обменных процессов нервной ткани — метаболические стимуляторы/ноотропные средства. Наиболее выражен их эффект в период восстановления ЦНС после повреждений, их неконтролируемый приём здоровыми, полноценно питающимися людьми не имеет под собой научной основы. Огромное количество различных метаболитов, аминокислот, пищевых продуктов рекламируется как средства «против усталости», «для улучшения работы мозга», однако следует иметь в виду, что подавляющее большинство из них относится к группе биологически активных добавок (БАД) и не имеет достоверных доказательств эффективности. Представляется неправомерным их назначение как наносящее ущерб авторитету врача, здоровью и финансовому состоянию пациента.

Только единичные соединения этой группы зарегистрированы как медицинские препараты (в том числе производные ГАМК — пирацетам, аминалон и др), причём их эффект наиболее выражен при сочетании с другими психотропными средствами. Фрагменты гипофизарных гормонов (АКТГ 4–10, лизин-вазопрессин) стимулируют мнестические функции в очень малых дозах (тысячные доли миллиграмма). На основе АКТГ 4–10 создан отечественный препарат «СЕМАКС», улучшающий процессы обучения и запоминания.

К психостимуляторам относятся:

1) производные ксантина (кофеин);
2) производные фенилалкиламина (фенамин, первитин);
3) производные фенилалкилпиперидина (меридил, пиридрол);
4) производные фенилалкилсиднонимина (сиднокарб, сиднофен).

Кофеин является 3,7-триметилксантином, стимулирует ЦНС, усиливает работу почек, сердца, скелетных мышц. Механизм действия кофеина связан с блокирани-

ем $A_1(P_1)$-рецепторов аденозина — одного из тормозных медиаторов, что приводит к стимуляции ЦНС. В высоких дозах метилксантины непосредственно блокируют фосфодиэстеразу, что приводит к накоплению цАМФ в ЦНС и на периферии, чем и опосредуется миорелаксирующий и психостимулирующий эффекты. Основной метаболит кофеина параксантин (1,7-диметилксантин) способен связываться с D_1-рецепторами дофамина, стимулируя активность дофаминергических систем, оказывающую психоэнергизующее действие. В некоторых случаях кофеин способен вызвать парадоксальную реакцию — угнетение ЦНС.

Кофеин способен суживать сосуды мозговых оболочек и тем самым снижать проявления головной боли и мигрени. Имеется значительное число комбинированных анальгетических и «противопростудных» средств, содержащих кофеин — цитрамон, кофетамин и др. Собственно кофеин выпускается в виде кофеина бензоата и может быть использован как тонизирующее средство, при гипотензии и астенических состояниях.

Синтетический кофеин входит как добавка в растворимый кофе, в некоторые «средства для похудания». Индивидуальная чувствительность либо употребление высоких доз могут вызвать проявления аритмии и гипертензивных реакций. Кофеин не относится к наркотическим средствам, однако высокодозовые препараты на его основе не следует назначать пациентам с сердечно-сосудистой патологией.

Наиболее сильным психостимулирующим действием обладают соединения из группы фенилалкиламинов (амфетамины). По механизму действия они относятся к непрямым адрено- и дофаминомиметикам, высвобождающим эти медиаторы из нервных окончаний. Сходным действием обладает кокаин.

Амфетамин (производился под названием Фенамин) — рацемат D- и L-изомеров фенилизопропиламина. Психостимулирующей активностью обладает только его D-изомер — декседрин, в значительной мере лишённый побочных эффектов фенамина (кардиотоксического и психотического). Психостимулирующий эффект амфетамина связан с усилением им высвобождения дофамина и норадреналина, что приводит к активации ЦНС. Как и другие фенилалкиламины, увеличивает физическую работоспособность, снижает аппетит, устраняет сон. Умственную работоспособность по объективным данным он не стимулирует, хотя пациенты субъективно отмечают её подъём, улучшение настроения. Препарат противопоказан лицам, чья деятельность связана с необходимостью быстрого решения сложных задач — операторам, лётчикам. Амфетамины вызывают физическую и психическую зависимость, толерантность (средняя терапевтическая доза 10–20 мг, а у наркоманов достигает нескольких граммов). Амфетамины относятся к одной из опаснейших групп наркотиков.

При хроническом употреблении непрямых адреномиметиков — амфетаминов и кокаина характерно поражение ЦНС (психозы, агрессивность) и сердечно-сосудистой системы, сходное с ишемической болезнью сердца.

В основе возбуждающего действия на мозг большой группы психостимуляторов (фенамин, первитин, меридил и др.) лежит их способность менять функцию катехоламинергических синапсов. Вызываемая ими поведенческая активация не развивается на фоне α-метилтирозина — ингибитора тирозингидроксилазы и одного из ключевых ферментов синтеза катехоламинов. Напротив, предварительное использование ингибиторов МАО усиливает их действие на ЦНС. Психостимуляторы также изменяют серотонинергическую передачу, модифицируют холин- и ГАМКергические эффекты. Однако влияние на катехоламинергические процессы является главной причиной психостимулирующего эффекта указанных соединений, объединяемых по характеру синаптического действия понятием «симпатомиметические психостимуляторы». Из указанных средств в настоящее время используется только эфедрин,

в основном как средство от ринита (за счёт местного сосудосуживающего действия на слизистые оболочки).

В поисках препаратов с более избирательным центральным действием создано большое число аналогов фенилалкиламинов. Известны меридил, пиридрол, сиднокарб и сиднофен. В отличие от фенамина они лишены аминогруппы. Атом азота у пиридрола и меридила, соответствующий азоту аминогруппы у фенамина, является частью гетероциклического кольца пиперидина, а у сиднокарба и сиднофена — сиднонимина. Обладая, по сравнению с фенамином, более слабым психостимулирующим действием, меридил и пиридрол лишены периферических адреномиметических свойств. Они не влияют на артериальное давление и работу сердца. Сиднокарб и сиднофен обладают психостимулирующим действием. Периферические адреномиметические эффекты выражены слабо. Часто развивается умеренное повышение артериального давления. Замена аминогруппы циклической структурой сиднонимина привела к исчезновению способности вызывать эйфорию и двигательное возбуждение. Пиперидиновые и сиднониминовые аналоги фенилалкиламинов более избирательно действуют на ЦНС и менее токсичны, чем фенамин.

За рубежом известен родственный амфетаминам препарат риталин для повышения внимания и лечения нарушений поведения у детей.

Стимуляторы, влияющие на адрено- и дофаминергические структуры, имеют ограниченное применение, однако их производные являются опасными наркотическими средствами. Лечение депрессивных состояний и повышенной утомляемости предпочтительнее проводить с помощью современных антидепрессивных средств. Метаболические стимуляторы, в том числе производные ГАМК наиболее эффективны в составе комбинированной терапии, их клиническая эффективность в качестве монотерапии требует дополнительных исследований и не всегда оправдана. Перспективным направлением является создание высокоспецифичных регуляторов мнестических функций на основе изучения механизмов формирования памяти и поведенческих реакций.

Как известно, при старении, нейродегенаративных заболеваниях, шизофрении и депрессии ухудшается когнитивная функция. Недавно было установлено, что ингибиторы фосфодиэстеразы, приводящие к увеличению содержания в клетке вторичных посредников цГМФ и/или цАМФ, улучшают внимание, память, усвоение информации и способность выполнять задания [14]. Объясняется это длительным эмоциональным подъёмом, связанным с ингибирования изоферментов фосфодиэстеразы, в первую очередь 2- и 9-го потдипов. Следует ожидать в ближайшем будущем создания избирательных ингибиторов фосфодиэстеразы, которые бы оказывали благоприятное действие на когнитивные функции без заметных побочных эффектов.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 8

1. *Вальдман А.В.* Теоретические аспекты поиска новых антидепрессантов. — М., 1990. — 160 с.
2. *Каркищенко Н.Н.* Фармакологические основы терапии. — М.: Медицина, 1996. С. 47–54.
3. *Раевский К.С.* Современные нейролептики: взаимодействие с системами нейротрансмиттеров мозга // Психиатрия и психофармакотерапия. 2000. № 5. С. 132–134.
4. *Семьянов А.В.* ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: Типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // Нейрофизиология (Neurophysiology). 2002. Т. 34, № 1. http://www.neuroscience.ru/index.php?option=com_content&task=view&id=20&Itemid=35.
5. *Сергеев И.И.* Психофармакотерапия невротических расстройств // Психиатрия и психофармакотерапия. 2003. Т. 5, № 6. С. 230–235.
6. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. — М., 1997. С. 232–251.
7. *Сергеев П.В.* Биохимическая фармакология. — М.: Высшая школа, 1982. С. 263–268.
8. Формулярная система. Федеральное руководство. Вып. 10. — М., 2009. С. 256–311.
9. *McGuire P., Howes O.D., Stone J.* Paolo Fusar-Poli P. Functional neuroimaging in schizophrenia: diagnosis and drug discovery // Trends in Pharmacological Sciences. 2008. V. 29, № 2. P. 91–98.
10. *Середенин С.Б., Воронин М.В.* Нейрорецепторные механизмы действия афобазола // Эксперим. и клин. фармакол. 2009. Т. 72, № 1. С. 3–11.
11. *Силкина И.В., Ганьшина Т.С., Мирзоян Р.С., Середенин С.Б.* ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного и нейропротекторного эффектов афобазола и пикамилона // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005. Т. 68, № 1. С. 20–24.
12. *Галаева И.П., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Середенин С.Б.* Исследование нейропротекторных свойств афобазола на экспериментальной модели геморрагического инсульта // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2005. Т. 140, № 11. С. 545–548.
13. *Carvalho L.A., Pariante C.M.* In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants // Stress. 2008. V. 11, № 6. P. 411–424.
14. *Reneerkens O., Rutten K., Steinbusch H. et al.* Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement // Psychopharmacology. 2009. V. 202. P. 419–443.

Глава 9

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ КОРТИКОСТЕРОИДОВ И ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Все стероидные гормоны являются производными циклопентанофенантренового ряда, состоящими из четырёх колец A, B, C и D, которые составляют скелет стероидной молекулы. Стероидные гормоны, исходя из биологического действия, а также последовательности и числа углеродных атомов в их молекулах, делят на четыре основные группы.

1. C_{18}-стероиды — эстрогены, с основными представителями эстрадиолом, эстроном, эстриолом.
2. C_{21}-стероиды — гестагены, с основным представителем прогестероном.
3. C_{19}-стероиды — андрогены, с основным представителем тестостероном.
4. C_{21}-стероиды — кортикостероиды, с основными представителями кортизолом, кортикостероном и альдостероном.

В отличие от многих других циклических соединений, характеризующихся плоской пространственной структурой, стероидные молекулы реализуют биологическое действие через трёхмерную структуру. Стероидным гормонам присуща стереоспецифичность действия, связанная с различными видами изомерии — оптической, геометрической и конформационной.

Для каждого из перечисленных видов стероидных гормонов существуют чувствительные клетки, содержащие соответствующие рецепторы. Надо отметить, что в ряде случаев одни стероидные гормоны могут выступать в качестве антагонистов рецепторов других стероидов (например, прогестерон является антагонистом рецепторов для глюкокортикоидов). В последнее время в результате развития химии появляется всё больше агонистов и антагонистов рецепторов стероидных гормонов, которые важны как для практической медицины, так и для выяснения гормонрецепторных взаимоотношений.

9.1. Химическое строение кортикостероидов

Кортикостероиды разделяют на минералокортикоиды (МК) и глюкокортикоиды (ГК). Они являются производными прогестерона.

Синтез ГК из холестерина происходит в пучковой зоне коры надпочечников путём последовательных ферментативных превращений в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Скорость-лимитирующим фактором является транспорт свободного холестерина из цитоплазмы в митохондрии, где под действием фермента CYP11 A1, встроенного во внутреннюю мембрану, он превращается в прегненолон. Единственным стимулятором синтеза ГК является АКТГ, уровень которого находится под контролем кортикотропин-рилизинг-гормона (гормон кортикотрофов гипоталамуса). В свою очередь синтез КРГ подавляется избытком ГК в крови. Совокупность принципов положительной и отрицательной связи обеспечивает оптимальный уровень ГК в крови, который высвобождается из надпочечников в пульсирующем режиме. При этом амплитуда и частота импульсов выше утром и минимальна ночью. У человека

концентрация кортизола в крови варьирует от 1 до 20 мкМ. За сутки вновь синтезируется в среднем 10–30 мг кортизола, 3 мг кортикостерона. У детей суточная выработка гидрокортизона составляет около 12 мг/м^2 поверхности тела. Время полужизни $t_{1/2}$ кортизола в плазме крови равен 90 мин. При стрессе концентрация ГК может увеличиваться в 5–10 раз. Надпочечники человека секретируют два гормона со свойствами глюкокортикоидов: кортизол (гидрокортизон) и кортикостерон. Оба обладают минералокортикоидной активностью, однако у кортизола она слабее, чем у кортикостерона.

К химическим группировкам, определяющим специфическую ГК-активность, относятся:

а) гидроксильная группа в 21-положении;

б) гидроксил при C_{11}; при отсутствии заместителя в 11-м положении соединения обладают только минералокортикоидной активностью (дезоксикортикостерон); при наличии кето-группы ГК-активность соединений проявляется только после восстановления в печени до 11-β-ОН, поэтому препараты, содержащие кето-группу (кортизон, преднизон), эффективны только при системном применении и местно не назначаются;

в) группа –ОН в 17-положении, что предполагает усиление ГК- и уменьшение МК-активности.

Синтетические препараты глюкокортикоидов. Направленная модификация стероидной структуры включает:

а) введение двойной связи между углеродными атомами C_1 и C_2; привело к созданию преднизола из гидрокортизона и преднизона из кортизона; полученные соединения превосходят исходные по ГК-активности в 3–5 раз и не обладают значимой МК-активностью; отношение активностей ГК/МК равно 300 : 1;

б) добавление метильной группы в 6-положение молекулы преднизолона позволило получить метилпреднизолон, который активнее предшественника ещё в 1,5–2 раза;

в) введение атома фтора в циклопентанпергидрофенантреновое ядро ГК дало начало новой группе синтетических препаратов ГК — галогенированным стероидам.

Присутствие фтора в 9-положение повышает общую, преимущественно минералкортикоидную активность — 9-α-фторкортизол в 10 раз активнее гидрокортизона по ГК-активности. В то же время по МК-свойствам он превосходит альдостерон. Дальнейшее повышение глюкокортикоидной и полная потеря МК-активности достигается α- или β-метилированием в положении 16. Эти фторированные соединения (метазоны) образуют группу с самой сильной ГК-активностью, известной до настоящего времени (триамцинолон, дексаметазон, бетаметазон). Аналогичный препарат беклометазон содержит в положении 9 атом хлора. Синафлан имеет 2 атома фтора в положении 6 и 9. Этерификация (в положении 21) позволяет получить препараты с пониженной всасываемостью для местного применения, в частности в дерматологии (например, флуоцинолона пивалат). Сукцинаты или ацетониды указанных препаратов водорастворимы и применяются в качестве препаратов для внутривенных инъекций (преднизолона сукцинат) или как препараты пролонгированного типа действия (триамцинолона ацетонид). Депо-эффект достигается и при использовании суспензии кристаллов.

9.2. Молекулярный механизм действия глюкокортикоидов

9.2.1. Рецепторы стероидных гормонов плазматических мембран клеток-мишеней. Первой структурой, с которой взаимодействуют стероидные гормоны в процессе реализации биологической активности на клеточном уровне, является

цитоплазматическая мембрана. В настоящее время для всех классов стероидных гормонов доказано существование на плазматических мембранах клеток-мишеней специфических рецепторов, которые опосредуют быстрые, негеномные эффекты стероидов, индуцируя изменения проницаемости мембраны для тех или иных ионов, или изменяя активность ферментов, образование вторичных посредников внутри клеток. Для доказательства существования мембранных негеномных эффектов стероидных гормонов мы использовали различных подходы: 1) изучение зависимости эффектов стероидов от времени (негеномные эффекты развиваются сразу, а геномные — не ранее, чем через 30 мин); 2) использование в эксперименте различных мембранных фракций и модельных мембран; 3) добавление к инкубируемым клеткам блокаторов геномных эффектов (актиномицина D или циклогексимида); 4) использования стероидов, иммобилизованных на макромолекулах, которые не проникают внутрь клетки и действуют только на её поверхности.

Характер связывания стероидных гормонов плазматическими мембранами компетентных клеток значительно отличается от характера связывания липосом.

Изучение связывания стероидов с мембранами гепатоцитов показало, что оно различно для тропного (кортикостерона) и нетропных (эстрадиола, тестостерона) гормонов: кортикостерон по сравнению с эстрадиолом и тестостероном связывается в большем количестве, особенно в области малых концентраций.

Анализ характера взаимодействия гормонов между собой (построение результатов в модифицированных координатах Лайнуивера–Бёрка) показал, что в случае ^{3}H-кортикостерона и кортизона имеет место прямая конкуренция за связывание с насыщаемой системой плазматических мембран гепатоцитов, а в случае ^{3}H-кортикостерона и эстрадиола и тестостерона — неконкурентное ингибирование.

Процесс связывания ^{3}H-кортикостерона является температурнозависимым, причём к изменению температуры чувствительны обе системы связывания гормонов, особенно ненасыщаемая.

Преинкубация изолированных плазматических мембран гепатоцитов с блокатором SH-группы — *n*-хлорбензоатом ртути — снижает включение кортикостерона насыщаемой, но не ненасыщаемой системой. Данный факт свидетельствует о важности SH-группы белков для функционирования насыщаемых «систем узнавания» глюкокортикоидов.

Протеолитические ферменты — проназа и папаин — также вызывают значительную потерю связывающей способности насыщаемых компонентов плазматических мембран и практически не воздействуют на их ненасыщаемые структуры. Белки, вероятно, несут основную нагрузку в работе «систем узнавания» кортикостерона.

Определённое значение в этой системе принадлежит сиаловым кислотам и фосфолипидам, о чём свидетельствует уменьшение поглощения кортикостерона плазматическими мембранами при воздействии на них ферментами нейраминидазой и фосфолипазой A_2.

Первичное распознавание клетками-мишенями тропных гормонов происходит на уровне плазматических мембран. Нарушение работы «узнающих» систем способно приводить к искажению физиологического ответа на гормональный сигнал.

В мембранах гепатоцитов присутствуют два вида участков, специфически связывающих кортизол с константами диссоциации $1{,}5 \cdot 10^{-9}$ и $4{,}1 \cdot 10^{-9}$ М и числом мест связывания 4,3 и 4,6 нмоль/г белка. При проведении анализа с большим рядом природных и синтетических стероидов за конкурентное связывание с плазматическими мембранами ^{3}H-кортизола были обнаружены высокая специфичность мембранных связывающих участков к природным глюкокортикоидам и ее отсутствие для дексаметазона (отметим, что в цитозоле присутствуют специфически связывающие участки как для кортизола, так и для дексаметазона). Результаты B. Koch

и др. свидетельствуют о наличии специфического связывания глюкокортикоидов с плазматическими мембранами гипофиза. В этом случае кортикостерон связывался с плазматической мембраной в большем количестве (примерно в 4 раза), чем дексаметазон. Кортикостерон, дезоксикортикостерон и прогестерон существенно снижали связывание ^{3}H-кортикостерона с данными мембранами, а дексаметазон и эстрадиол обладали меньшим эффектом. В противоположность этому указанные стероиды не вытесняли ^{3}H-дексаметазон из мембран, что свидетельствует, вероятно, о неспецифическом связывании синтетического стероида. Экстрагированный тритоном X-100 из плазматических мембран, кортикостеронсвязывающий материал осаждался при центрифугировании (константа седиментации 4 S).

Кроме того, в плазматических мембранах клеток плаценты человека были выявлены участки, специфически связывающие кортикостерон, в плазматических мембранах клеток почек крыс — связывающие альдостерон, плазматических мембранах клеток матки крыс — связывающие 17-β-эстрадиол.

Логично предположить, что результатом специфического связывания стероидных гормонов с плазматическими мембранами может быть развитие биохимического ответа уже на уровне самой мембраны.

Действительно, нам удалось установить, что активность маркерного фермента плазматических мембран клеток 5′-нуклеотидазы в суспензии гепатоцитов и их плазматических мембран характерно изменяется в присутствии кортикостерона и гидрокортизона: при концентрации гормонов 0,1 и 10 нМ наблюдается снижение ферментативной активности на 12–16%. В то же время тестостерон, эстрон и 17-β-эстрадиол снижают активность 5′-нуклеотидазы клеток на 25–30% и мембран на 15–20% при концентрациях 0,1 нМ и вызывают постепенное возрастание активности до исходного уровня по мере увеличения концентрации до 1 мкМ. Поэтому можно говорить о специфической реакции мембраносвязанного фермента на взаимодействие глюкокортикоидов с системами «узнавания» плазматических мембран компетентных клеток.

Исследование флюоресценции $АНС^-$ в плазматических мембранах гепатоцитов и липосомах показало, что все изученные стероиды снижают интенсивность флюоресценции зонда в мембранах пропорционально логарифму концентрации гормона в среде. Однако если в среде этот эффект коррелирует с коэффициентом распределения стероидных гормонов в системе липид/вода (эстрон, эстрадиол, кортикостерон, тестостерон, кортизол), то в плазматических мембранах такая корреляция нарушается. В них глюкокортикоиды снижают интенсивность флюоресценциии зонда сильнее, чем более гидрофобные эстрогены. Обработка плазматических мембран блокатором SH-групп — n-хлорбензоатом ртути — снимает различия в действии стероидов на флюоресценцию $АНС^-$ в биомембранах и липосомах.

Итак, при взаимодействии тропных стероидных гормонов с плазматическими мембранами имеют место специфические конформационные и функциональные изменения мембран. Следовательно, есть все основания считать, что участки плазматических мембран компетентных клеток, которые специфически связывают стероидные гормоны, выполняют рецепторную функцию.

Экстраядерные эффекты стероидных гормонов имеют несомненное физиологическое значение. Например, тестостерон в физиологической концентрации 10^{-8} М вызывает очень быструю (менее чем за 30 с) стимуляцию поглощения $^{45}Ca^{2+}$ срезами почек. В этих же концентрациях гормон снижает содержание Ca^{2+} в митохондриальной фракции и увеличивает количество растворимого Ca^{2+}, что указывает на мобилизацию внутриклеточных резервов этого катиона. Данное влияние тестостерона на обмен Ca^{2+} опосредует его способность стимулировать эндоцитоз и транспорт гексоз

и аминокислот в срезах почек, так как повышенное содержание Ca^{2+} в цитоплазме клеток служит регуляторным сигналом для активации транспортных реакций.

Мембранные рецепторы принимают участие не только в переносе гормона внутрь клетки, но и в реализации биологической активности стероидных гормонов. ГК проникает в клетку с помощью специфических транслоказ. Следовательно, мембранные рецепторы ГК могут выполнять 2 функции: 1) направленный транспорт ГК внутрь клетки, в частности в гепатоциты, где стероиды метаболизируются; 2) активацию системы вторичных посредников с созданием так называемого клеточного фона (контекста), способствующего или препятствующего проведению независимых сигналов (модуляторная роль), например потенцирование эффектов катехоламинов (за счёт повышения внутриклеточной концентрации цАМФ) или торможение эффектов М-холиномиметиков (за счёт снижения уровня цГМФ) (рис. 9.1).

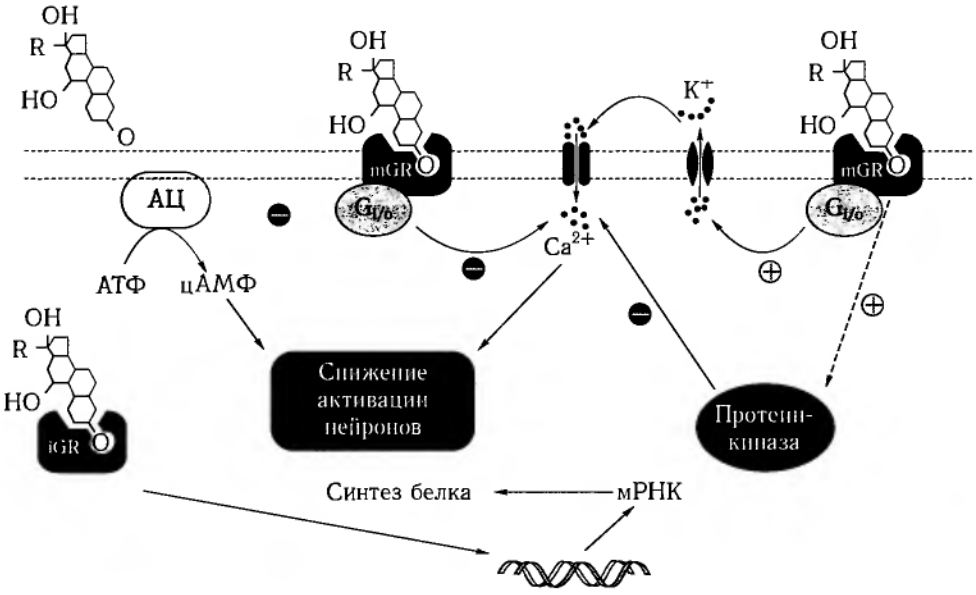


Рис. 9.1. Возможные механизмы негеномных эффектов глюкокортикоидов

Мембранные эффекты стероидов могут быть результатом их взаимодействия с мембранными рецепторами глюкокортикоидов (mGR) и опосредованы G-белками (G_i или G_o), что проявляется в ингибировании аденилатциклазы (АС), снижении образования цАМФ, снижении внутриклеточного уровня кальция или всеми эффектами одновременно. Уменьшение содержания кальция в клетке может быть обусловлено ингибированием его проникновения через каналы L-типа. Глюкокортикоиды, связываясь с внутриклеточными рецепторами (iGR), могут вызывать отсроченные по времени эффекты, обусловленные изменением экспрессии генов.

Важно отметить, что негеномные эффекты стероидных гормонов, как правило, развиваются быстро (< 10 с или < 10 мин), но существуют данные об опосредованных мембранных эффектах стероидов, которые возникают через 30 мин или даже 3 ч после воздействия гормона. Установлено, что дексаметазон способен ингибировать транспорт природных аминокислот в культивируемые клетки гепатомы, начиная с 30-й минуты с t_S, равным 90–120 мин.

Суммируя изложенное выше, мы считаем, что многие физиологические и биохимические изменения в клетке при действии стероидных гормонов, их различный

и даже противоположный характер действия находят своё объяснение с учётом вклада работы систем «узнавания» плазматических мембран клеток-мишеней. Можно утверждать, что «мембранный этап» играет важную роль в процессе рецепции гормонов и в их биологическом действии, что позволяет вычленить его как отдельную стадию реализации активности стероидных гормонов.

Если раньше исследования рецепторных механизмов действия стероидных гормонов проводились в основном с целью выяснения причин чувствительности тех или иных клеток к стероидному гормону, то теперь, после появления методов генетической рекомбинации и выяснения химической структуры рецепторов стероидных гормонов, встал вопрос об их гетерогенности и вариабельности, как основы совершенствования фармакотерапии различных гормонозависимых заболеваний с помощью селективных чистых (полных) или частичных агонистов и антагонистов.

9.2.2. Внутриклеточные рецепторы стероидных гормонов. После проникновения внутрь клетки стероидные гормоны связываются с цитозольными рецепторами, относящимися к суперсемейству рецепторов $S/T/A_1$ — лигандактивируемых транскрипционных факторов. В их структуре выделяют домены, связывающиеся с лигандом, ДНК и ответственные за регуляцию транскрипции (табл. 9.1).

Таблица 9.1

Домены внутриклеточных рецепторов стероидных гормонов и их функции

A/B	C	D	E	F
Белок-белковые взаимодействия Активация транскрипции	Узнавание последовательности ДНК Связывание с ДНК Димеризация	Димеризация Определение локализации в ядре клетки	Связывание лиганда Активация транскрипции Связывание белков теплового шока и иммунофилинов Определение локализации в ядре Димеризация	Активация транскрипции

N-концевой участок рецепторов (A/B-домен) отличается вариабельностью; он содержит от 25 (рецептор витамина Д) до 603 (рецептор минералокортикоидов) аминокислотных остатков. Домены C, D и E, ответственные за связывание с ДНК, характеризуются консервативностью и мало отличаются друг от друга у рецепторов стероидов разных классов. Участок рецепторов, связывающийся с ДНК, содержит 2 выступающие цинксодержащие структуры C_1 и C_2. C_1 принимает участие в непосредственном связывании с гормоночувствительными элементами (ГЧЭ) ДНК, а C_2 — в образовании гомодимеров и гетеродимеров рецепторов.

В результате взаимодействия гормонрецепторного комплекса с ГЧЭ ДНК модулируется транскрипция многих зависимых генов и в итоге — клеточный фенотип.

Основная функция белков теплового шока заключается в способствовании перехода гормоносвязывающего домена рецептора в конформацию, характеризующуюся высоким сродством к стероиду. Связывание гормона регулирует взаимодействие гормоносвязывающего домена с белками теплового шока.

Семейство белков теплового шока hsp90 широко распространено в клетках млекопитающих; они составляют 1–2 % от всех белков цитозоля. В клетках млекопитающих этот белок кодируется 2 генами; человеческий α-белок hsp90 на 86 % по своему аминокислотному составу гомологичен β-белку hsp90. В интактном виде белок hsp90 представляет собой димер с молекулярной массой 165 000–180 000 Да; он способен образовывать олигомеры из 4 или более субъединиц. Чаще образуются $\alpha\alpha$- или

$\beta\beta$-гомодимеры этого белка, хотя встречаются и его гетеродимеры. Очищенные hsp-белки имеют АТФ-азную активность и подвергаются аутофосфорилированию. Однако для реализации внутриклеточной функции этих белков нет необходимости в присутствии АТФ. Известно, что казеинкиназа II связывается с hsp-белками эукариот. В покое большинство hsp-белков находится в цитоплазме и в небольшом количестве — в ядре клеток. При стрессе эти белки переходят из цитоплазмы в ядро клетки. В большинстве случаев hsp-белки диффузно распределены в цитоскелете — в мембранах микросом, микротрубочках и микрофиламентах.

В интактных клетках в отсутствии лиганда рецепторы глюкокортикоидов, прогестинов и эстрогенов существуют в виде гетеротетрамерных структур: одной молекулы рецепторного белка, двух молекул hsp-белков и одной молекулы полипептида с молекулярной массой около 50 кДа, называемого иммунофилином. Однако в других условиях выделения и идентификации отмеченных комплексов, а именно более мягких условиях их экстрации, одна рецепторная молекулы находилась в связывании с 4 молекулами hsp-белка.

Кроме того, имеются биохимические данные о том, что указанные гетерокомлексы 9S-глюкокортикоидных рецепторов связаны с нитями актина. Однако роль микротрубочек в аккумуляции рецепторных комплексов в ядре клетки пока доказана только для рецепторов витамина D (вещества, разрушающие микротрубочки, ингибируют модуляцию генной активности витамином D, но не прогестинами или глюкокортикоидами).

В рецепторных гетерокомлексах, определяемых иммунологически, выявляются также другие белки, в том числе hsp70 и p23. Временным участником рецепторных гетерокомплексов является p60-белок. Иммунофилины и фосфатаза связываются с рецепторными гетерокомплексами (hsp90-белками) при участии своих тетратрикопептидных доменов.

Hsp-белки связываются с рецепторами стероидов АТФ-зависимым образом с неразвёрнутыми областями рецепторного белка, возможно посредством гидрофобных взаимодействий (гидролиз АТФ приводит к высвобождению белка из этой связи). В интактных клетках hsp-белок диффузно распределён между цитоплазмой и ядром, но при тепловом шоке он концентрируется в ядре. В отличие от hsp90-белка, hsp70-белок не диссоциирует от стероидного рецептора при связывании стероида или повышении ионной силы. Хотя он присутствует в трансформированном гормональном рецепторе, на связывание последнего с ДНК влияния не оказывает. При добавлении АТФ к комплексу прогестеронового рецептора с hsp70-белком при 23 °C наблюдалась его диссоциация, что указывает на индукцию этого процесса гидролиза АТФ. Полагают, что hsp70-белок взаимодействует с гормоносвязывающим доменом в участке, который отличается от участков связывания hsp90-белка. Следует отметить, что в ряде случаев гормон-рецепторные гетерокомплексы не содержат в своём составе hsp70-белка. На этом основании можно полагать, что данный белок, обычно взаимодействующий с многими белками клетки, не играет какой-либо существенной роли в реализации функциональной активности рецепторов стероидных гормонов, хотя и может принимать участие в регуляции образования гетерокомплекса стероидных рецепторов в цитозоле и переходе его в ядро.

Если роль p23-белка в функционировании гетерокомплекса стероидных рецепторов ещё не изучена, то уже есть более точные сведения об участии в нём иммунофилинов — консервативных белков, которые обладают пептидилпропилизомеразной активностью и названы так вследствие способности связывать иммунодепрессанты. С гетерокомплексами рецепторов стероидных гормонов связываются три типа иммунофилинов, имеющих большую молекулярную массу. Благодаря наличию тетратрикопептидных доменов иммунофилины взаимодействуют с hsp90-белками. Само

взаимодействие иммунофилинов с hsp90-белками посредством тетратрикопептидного домена характеризуется консервативностью и является основным белковым взаимодействием как у растений, так и животных. Иммунофиллины, взаимодействующие с гетерокомплексами рецепторов стероидных гормонов всех типов, имеют молекулярную массу около 59 кДа и принимают участие в разворачивании молекулы рецептора.

В образовании и трансформации гетерорецепторного комплекса 9S, состоящего из гормоносвязывающего белка, белков hsp90 и hsp70, белка p23 и иммунофилина, принимают участие АТФ и Mg. Эти процессы являются температурозависимыми. Рецепторы, не содержащие hsp-белка, при нагревании теряют способность связывать гормон. В присутствии АТФ-образующей системы количество hsp70-белка, связанного с рецепторным гетерокомплексом, уменьшается, а hsp-белка и p23-белка увеличивается.

В ответ на связывание с гормоном происходит отсоединение мономера рецептора от олигомерного комплекса и у мономеров появляется способность к димеризации и последующему взаимодействию с ГЧЭ, которые обычно находятся в регуляторной области генов, отвечающих на стероиды. Взаимодействие гормонорецепторного комплекса с ГЧЭ приводит к увеличению или снижению процессов транскрипции. Механизмы влияния стероидов на активность генов пока не выяснены. Однако не вызывает сомнения, что они во многом определяются характером комплексообразования стероида с цитозольным рецептором и исходной структурой молекулы рецепторов. Согласно полученным в последние годы данным, эти рецепторы, во-первых, активны только в виде димеров, во-вторых, мономеры рецепторов стероидов одного класса не одинаковы, поэтому могут существовать различные димеры, и, в третьих, мономеры рецепторов разных классов могут взаимодействовать между собой, т. е. могут образовываться гетеродимеры стероидных рецепторов, представляющие собой гетерогенные рецепторные образования.

Рецепторы ГК присутствуют в клетке в двух основных состояниях: неактивированной и активированной форме. Переход от одной формы к другой осуществляется с помощью фосфорилирования неактивной формы с образованием фосфопротеина. Катализирует реакцию цАМФ-зависимая протеинкиназа. В отсутствии гормона активированный рецептор нестабилен и практически все рецепторы ГК находятся в неактивном состоянии. В присутствии ГК, который может связываться как с активной, так и неактивной формой рецептора, происходит смещение равновесия в сторону образования активированной формы гормон-рецепторного комплекса, способной проникать в ядро клеток-мишеней. Транслоцированные гормон-рецепторные комплексы, связываясь с ГЧЭ — определённой последовательностью нуклеотидов ДНК регуляторного участка генов, вызывают дерепрессию гена, инициацию транскрипции ДНК, синтез мРНК и наработку специфических белков, которые, в конечном счёте, и определяют биологический ответ клетки на гормональный стимул. Одним из важнейших глюкокортикоидзависимых протеинов является липокортин, который ингибирует фермент фосфолипазу A_2 и тем самым подавляет синтез простагландинов и лейкотриенов, играющих ключевую роль в развитии воспалительной реакции. Для проявления полного эффекта ГК необходимо несколько часов. Максимум фармакологической активности ГК приходится на тот период времени, когда их пиковые концентрации в крови уже позади.

Характер действия кортикостероидов на многие ткани-мишени свидетельствует о наличие в клетках этих тканей для них цитозольных рецепторов. Легче перечислить органы, в которых не обнаружены рецепторы для кортикостероидов (у крыс это матка, тощая кишка, жировая ткань и мочевой пузырь, а у кроликов, по-видимому, и последние три ткани содержат плазматические рецепторы для кортикостероидов). Глюкокортикоиды могут стимулировать или ингибировать процесс транскрипции.

Последовательность нуклеотидов ДНК, которая образует ГЧЭ стимулирующего типа для глюкокортикодов представляет собой цепочку ГГТАЦАпппТГТТЦГ, где п — любой нуклеотид. Идентифицированы также некоторые гены, экспрессия которых негативно регулируется кортикоидами. В первую очередь это касается гена проопиомеланокортина, а также генов цитокинов, принимающих участие в воспалении и иммунных реакциях, коллагеназы и стромелизина. При этом гормон-рецепторный комплекс непосредственно связывается с белком активатором транскрипции (АР-1), который стимулирует регуляторы транскрипции семейств Fos и Jun, индуцирующие экспрессию многих генов, включая и те, которые ответственны за синтез цитокинов и коллагеназы. Глюкокортикоиды ингибируют активность АР-1.

Рецепторы глюкокортикоидов различных тканей могут иметь неодинаковую молекулярную массу, сродство к лигандам и другие физико-химические характеристики. Более того, в одних случаях активация этих рецепторов сопровождается уменьшением их размеров (тимоциты, клетки опухоли гипофиза), а в других этого не происходит (семенники). Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности различий в функционировании глюкокортикоидных рецепторов в той или иной ткани.

Тем не менее, можно отметить некоторые общие закономерности взаимодействия стероидов с глюкокортикоидными рецепторами. Анализ зависимости сродства стероидов к этим рецепторам и термодинамических параметров указанных взаимодействий свидетельствует о том, что при физиологических условиях основной движущей силой связывания стероидов с рецепторами являются гидрофобные взаимодействия и что индукция стероидом специфических конформационных изменений рецептора необходима для активации хроматина гормон-рецепторным комплексом. Изменения в структуре цитозольных рецепторов вследствие мутации могут привести к изменению чувствительности клеток к глюкокортикоидам. Было установлено существование у мутантных клеток лимфомы мышей S49 цитозольных рецепторов, которые, хотя и связывают стероид и взаимодействуют с хроматином, не индуцируют ранние изменения в структуре хроматина и развитие цитотоксического эффекта гормонов. В этом случае глюкокортикоидный рецептор имел низкую молекулярную массу (39 000). У чувствительных к глюкокортикоидам клеток лимфомы цитозольный рецептор имеет молекулярную массу 87 000. Это, по-видимому, указывает на потерю при мутации какой-то части рецептора, которая является ответственной за активацию хроматина. Предполагается, что эффекторная функция цитозольного рецептора глюкокортикоидов реализуется при участии С-концевой части рецептора. Действие глюкокортикоидов носит разнонаправленный характер: они стимулируют анаболические процессы в печени (повышают синтез ДНК, РНК, белков), а на остальные органы (скелектные мышцы, почки, сердце, кожа, лёгкие) оказывают катаболическое действие.

Стероиды, взаимодействующие с глюкокортикоидными рецепторами, можно классифицировать на чистые агонисты, частичные агонисты/антагонисты и чистые антагонисты.

Агонисты, как правило, медленнее, чем антагонисты связываются с цитозольными рецепторами, и время жизни комплекса агонист–рецептор больше, чем антагонист–рецептор. Существование чистых агонистов и антагонистов предполагает существование двух различных функциональных форм или состояний рецептор-стероидного комплекса и различий во взаимодействии агонистов и антагонистов с цитозольными рецепторами. Изучив кинетику комплексообразования ряда стероидов с глюкокортикоидными рецепторами цитозоля тимуса крыс, установили, что во всех случаях диссоциация комплексов описывается монофазной кривой первого порядка, хотя константы скоростей диссоциации для отдельных стероидов различны: для агонистов (триамцинолона, дексаметазона, преднизолона и кортикостерона) K_{-1} равна $2{,}78 \cdot 10^{-2}$–$4{,}91 \cdot 10^{-1}$, а для частичных агонистов/антагонистов (N-дезоксикортико-

стерона, альдостерона и N-дезоксикортизола) и чистых антагонистов (прогестерона и 17-гидроксипрогестерона) K_{-1} равна 0,17–9,02 · 10^{-3} мин$^{-1}$.

Ассоциация стероидов с рецепторами описывалась кинетикой второго порядка Михаэлиса–Ментен, которая наиболее выражена для прогестерона (для агонистов K_{+1} была, как правило, выше, чем для антагонистов).

Расчёты, основанные на определённых кинетических параметрах, показали, что значительная часть антагонист-рецепторных комплексов (33% в случае прогестерона) находится в промежуточном состоянии, в то время как все агонист-рецепторные комплексы — в прочно ассоциированном состоянии.

Поскольку высокие концентрации чистого или частичного антагониста, но не чистого агониста ускоряют скорость диссоциации комплекса ^{3}H-дексаметазон–рецептор, можно полагать, что для антагонистов на рецепторе существует второй специфически связывающий участок, взаимодействие с которым приводит по механизму отрицательной кооперативности к снижению сродства первичного специфически связывающего участка для агонистов.

Необходимо подчеркнуть, что глюкокортикоидные рецепторы — это мобильные структуры, чувствительные к температуре, ионной силе раствора, воздействию хелатных веществ, глицерина, антагонистов кальмодулина, трифторперазина, винбластина или пропранолола (последние действуют как глюкокортикоидные антагонисты, непосредственно взаимодействуя с их рецепторами). С физиологической точки зрения важным является участие эндогенных Ca^{2+} и Mg^{2+} в процессах стабилизации и трансформации глюкокортикоид-рецепторного комплекса.

Особый интерес представляет дальнейшая судьба гормон-рецепторного комплекса после его взаимодействия с хроматином.

P. Aranyl в модельных исследованиях установили, что при температуре 25–37 °C и высокой ионной силе (0,3 М KCl) происходит активация комплекса цитозольный рецептор — ^{3}H-триамциналон и он связывается с ДНК-целлюлозой. Однако активация комплекса является преходящей, за ней следует дезактивация, зависящая от температуры инкубации и концентрации KCl и приводящая к снижению связывания рецептора с ДНК-целлюлозой. В то же время при этом изменении специфического связывания рецептора с триамциналоном не наблюдалось. Ионы молибдата заменяли процессы активации и дезактивации, но не предотвращали тепловую активацию гормон-рецепторного комплекса. Можно полагать, что процесс дезактивации, описанный P. Aranyl, аналогичен тому, что имеет место в живых клетках при уменьшении концентрации гормона (известно, что при исчезновении гормона рецепторы покидают ядро и появляются в цитоплазме в свободном состоянии).

Важные данные получены о динамике функционирования триамциналон-рецепторного комплекса в клетках гепатомы Мориса 7777, хотя и косвенно. При этом, на начальных этапах гормональной индукции в клетки проникает максимальное количество специфически связанного триамциналона, которое постепенно уменьшается в процессе последующей инкубации. С увеличением времени инкубации связывание ^{3}H-триамциналона всё в меньшей степени подавлялось избытком немеченого гормона, и снижалась скорость выхода ^{3}H-триамциналона из ядер в свободной от гормона среде. После удаления гормона из среды клетки сохраняли способность индуцировать синтез тирозинаминотрансферазы на протяжении 10 ч и более, хотя уже через 3 ч количество связанного с клетками гормона снижалось до 20–25% от исходного уровня. При этой скорости последующая деиндукция синтеза фермента зависела от времени инкубации клеток со стероидом; в клетках, проинкубированных с триамциналоном в течение 10 мин, деиндукция развивалась медленнее, чем в клетках преинкубированных с ним в течение 48 ч. Поскольку известно, что взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с хроматином приводит к образованию новой конфор-

мационной структуры, обеспечивающей повышенный синтез специфических молекул мРНК, можно полагать, что подобная конформационная структура сохраняется в активном состоянии довольно продолжительное время (более 10 ч) и при снижении концентрации связанного гормона (дезактивация гормон-рецепторного комплекса).

9.2.3. Гетерогенность рецепторов стероидных гормонов, обусловленная их димеризацией. Как уже отмечалось, в настоящее время имеются доказательства существования различных по структуре мономеров рецепторов некоторых стероидных гормонов и при димерации могут образовываться гомо- и гетодимеры. В частности, имеются данные, свидетельствующие о возможности образования гетеродимеров рецепторов глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Данные рецепторы, кроме сходства в структуре консервативных областей, имеют высокую степень гомологии и в участках узнавания лиганда. Оказалось, что гормон-рецепторный комплекс регулирует экспрессию генов, связываясь с ДНК не только в виде димеров, но и гетеродимеров. Последние, специфически взаимодействуя с ДНК, могут вызывать эффекты, которые отличаются от эффектов, возникающих при взаимодействии с хроматином димерных комплексов рецепторов стероидных гормонов.

У людей глюкокортикоидные рецепторы связывают кортизол со сродством, которое в 10 раз меньше сродства альдостерона и кортизола к минералокортикоидным рецепторам. В результате в нейрональной ткани минералокортикоидные рецепторы, по сравнению с глюкокортидными, в той же степени заняты кортизолом при значительно меньшей его концентрации. В нейрональной ткани кортизол не активирует минералокортикоидные рецепторы, а в клетках почек существует 11-β-гидроксистероиддегидрогеназа типа II (её нет в нейрональной ткани), которая катализирует превращение кортизола в кортикостерон, имеющий слабое сродство к минералокортикоидным рецепторам. Вследствие этого в почках эти рецепторы свободны для активации минералокортикоидами.

Важно подчеркнуть, что минералокортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы одновременно присутствуют в ряде клеток — лимфоцитах, миоцитах, клетках гиппокампа, почек. В то же время в печени их сравнительно мало. Можно предполагать, что присутствие двух различных рецепторов, отвечающих на один и тот же гормональный сигнал, обеспечивает способность клеток более гибко реагировать на изменения концентрации кортикостероидов, которые могут быть в пределах от 0,5 до 100 нМ. Доказательством возможности совместного функционирования глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов могут служить некоторые данные, согласно которым у адреналэктомированных крыс подавление секреции АКТГ имсет место только при совместном введении дексаметазона (селективный агонист только глюкокортикоидных рецепторов) и низких доз кортикостерона (в этих условиях стероид преимущественно связывается с минералокортикоидными рецепторами), а в отдельности указанные стероидные препараты в этом отношении неэффективны.

Глюкокортикоидные рецепторы так же, как и димеры гестагенных и андрогенных рецепторов, узнаются двумя инвертированными повторяющимися последовательностями ДНК, разделёнными 3 нуклеотидами. Гетеродимеризация глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов приводит к увеличению их связывания с ДНК и стимуляции транскрипции генов. Могут существовать значительные вариации в выраженности биологических эффектов кортикостероидов в зависимости от соотношения их концентраций в физиологических и патологических условиях.

Гетеродимеры кортикостероидных рецепторов связываются с ДНК сильнее, чем гомодимеры; в этом случае они снижают эффект гомодимерных гормонорецепторных комплексов. Этот феномен, по-видимому, имеет важное клиническое значение, связанное с возможностью снизить побочное действие длительного применения кор-

тикостероидов в высоких дозах. Например, дексаметазон, в отличие от кортикостерона, в однократной дозе у крыс вызывает апоптоз гормоночувствительных клеток гипоталамуса и, как следствие, снижение экскреции АКТГ. При этом предварительное введение крысам кортикостерона блокирует данный эффект дексаметазона, что может быть обусловлено предотвращением кортикостероном образования гомодимерных рецепторов, в его отсутствии формирующихся при действии дексаметазона. Отсюда следует необходимость пересмотра целесообразности использования специфических лигандов глюкокортикоидных рецепторов типа дексаметазона в качестве противовоспалительных препаратов. В этом отношении более безопасны природные кортикостероиды или их синтетические аналоги, например преднизолон, которые сбалансированно влияют на экспрессию генов и не вызывают гибели чувствительных к ним клеток гипоталамуса или тимуса (необходимое условие предотвращения таких системных эффектов глюкокортикоидов, как иммунодепрессия и подавление секреции эндогенных кортикостероидов). Принимая во внимание эти рассуждения, можно предположить, что отсутствие значительных побочных системных эффектов у новых представителей негалогенизированных стероидов, производных преднизолона, и наличие таковых у фторированных кортикоидов, имеющих сходство с дексаметазоном, обусловлено, по крайней мере частично, именно особенностями рецепторной димеризации в присутствии этих стероидов.

9.2.4. Физиологическая роль глюкокортикоидных гормонов. ГК прямо или опосредованно регулируют практически все физиологические и биохимические процессы в организме. Органами- и тканями-мишенями для ГК являются печень, скелетные мышцы, лимфоидная и соединительная ткани, почки, сердце, кожа, лёгкие. При недостаточности ГК (болезнь Аддисона) наблюдается: гипогликемия, снижение запасов гликогена в тканях, гиперчувствительность к инсулину, задержка роста, уменьшение сопротивляемости к травмам, инфекциям, кровотечению. Под влиянием заместительных доз кортизола исчезают нарушения метаболизма органических соединений, связанные с недостаточностью надпочечников. При выраженной потере соли необходимо назначение ещё и минералокортикоидов. Необходимо различать эффекты физиологических или заместительных доз кортизола и его фармакологических доз. Физиологические дозы достаточны для восстановления всех функций, нарушенных при недостаточности надпочечников; у человека (в отсутствии стресса) они ненамного превышают величину суточной секреции кортизола — 25–40 мг/сут. При использовании более активных стероидов нужно вводить соответствующий коэффициент. Фармакологические дозы могут быть эквивалентны 60–200 мг кортизола/сут.

Водно-электролитный обмен. Замедление выделения из организма натрия и воды за счёт увеличения реабсорбции в дистальном отделе почечных канальцев, усиление выведения калия — эти минералокортикоидные эффекты в большей степени присущи природным ГК (кортизону и гидрокортизону), в меньшей — полусинтетическим (преднизону, преднизолону, метилпреднизолону). У фторированных препаратов — триамцинолона, дексаметазона и бетаметазона — минералокортикоидная активность отсутствует.

К метаболическим эффектам ГК относятся: индукция глюконеогенеза в печени; протеолиз в скелетных мышцах, костном мозге и других тканях; увеличение содержания в печени гликогена; уменьшение проницаемости мембран для глюкозы, глюкозурия вплоть до развития стероидного диабета (ГК являются контринсулярными гормонами). Изменение соотношения в утилизации скелетными мышцами углеводов и жиров: ускорение мобилизации и окисления депонированных жиров, уменьшение утилизации глюкозы. Угнетение синтеза белка, усиление процессов

катаболизма, особенно в коже, в мышечной и костной тканях. Это проявляется похуданием, мышечной слабостью, атрофией кожи и мышц, стриями, кровоизлияниями, замедлением заживления ран. Как следствие распада белкового матрикса костей и гипокальциемии развивается остеопороз. Перераспределение подкожной жировой клетчатки по кушингоидному типу вследствие того, что в тканях конечностей преобладает липолиз, а в тканях груди, шеи, лица, плечевого пояса — липогенез. ГК угнетают всасывание кальция в кишечнике, способствуют выходу кальция из костной ткани и усиливают его почечную экскрецию. В результате могут развиваться гипокальциемия и гиперкальциурия.

Влияние ГК на кровеносную и лимфоидные системы характеризуется: снижением количества эритроцитов и уровня гемоглобина, лимфоцито- и эозинопенией (уменьшение количества циркулирующих лимфоцитов и эозинофилов происходит преимущественно вследствие перераспределения их между кровеносным руслом и другими компартментами — костным мозгом, селезёнкой, лимфатическими узлами). После приёма даже одной дозы ГК отмечается снижение уровня лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов, базофилов с одновременным развитием нейтрофильного лейкоцитоза и, возможно, небольшим сдвигом формулы влево. Число нейтрофилов в среднем повышается на 4000/мм^3 (1700–7500/мм^3). Максимум изменений в крови отмечается через 4–6 ч, восстановление исходного состояния — через 24 ч. В отношении эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов ГК демонстрируют прямо противоположные эффекты — апоптоз эозинофилов и удлинение жизни нейтрофилов. После завершения длительного курса ГК-терапии изменения картины крови сохраняются на протяжении 1–4 недель. ГК повышают чувствительность адренорецепторов к катехоламинам, усиливают прессорное действие ангиотензина-II. Они уменьшают проницаемость капилляров, поддерживают нормальный тонус артериол, сократимость миокарда. Недостаточность коры надпочечников характеризуется низким сердечным выбросом, расширением артериол, слабой реакцией на адреналин. В сочетании с гиповолемией, вызванной дефицитом минералокортикоидов, эти изменения могут вести к сосудистому коллапсу.

Противовоспалительное, иммуномодулирующее и противоаллергическое действие. ГК угнетают все фазы воспаления, независимо от вызвавшей его причины. ГК ингибируют образование и высвобождения медиаторов воспаления, к которым относятся:

1) метаболиты арахидоновой кислоты;

2) активные амины, содержащиеся в секреторных гранулах мастоцитов (гистамин, серотонин);

3) кинины, факторы хемотаксиса, продукты системы комплимента.

ГК ингибируют активность мембранного фермента фосфолипазы A_2, за счёт индукции синтеза её специфического ингибитора — липокортина. Ингибирущее влияние ГК на синтез простагландинов определяет их вазоконстрикторное и антиэкссудативное действие. ГК снижают чувствительность нейтрофилов и эозинофилов к хемотаксическим факторам, уменьшают клеточную инфильтрацию очага воспаления.

Механизм антиаллергического и иммунопрессивного действия ГК включает:

1) ингибирование продукции факторов роста и дифференцировки иммунной системы (лимфокинов, тимозинов);

2) прямое супрессирующее влияние на активность иммунокомпетентных клеток (макрофагов, В- и Т-лимфоцитов); ГК снижают антителопродукцию, подавляют клеточный иммунитет, вызывают лизис Т-лимфоцитов;

3) ингибирование IgE-опосредованного высвобождения гистамина и лейкотриенов из базофилов;

4) подавление высвобождения лизосомальных ферментов и простагландинов из нейтрофилов.

ГК стабилизируют клеточные мембраны, мембраны лизосом, угнетают пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. ГК угнетают пролиферацию лимфоидной ткани и клеточный иммунитет, что лежит в основе их применения при пересадке органов и тканей. ГК тормозят образование и нарушают кинетику Т-лимфоцитов (в большей степени Т-хелперов, чем Т-супрессоров), снижают их цитотоксическую активность. В-лимфоциты более устойчивы к действию ГК, но введение высоких доз метилпреднизолона ведёт к снижению концентрации иммуноглобулинов, что связано с первоначальным усилением их катаболизма и последующим торможением синтеза. В то же время, у больных с иммунодефицитом ГК снижают супрессорную активность лимфоцитов, восстанавливая тем самым уровень иммуноглобулинов. ГК препятствуют взаимодействию иммуноглобулинов с тучными клетками, макрофагами, ингибируя высвобождение из них биологически активных веществ. В последние годы выявлена способность ГК влиять на систему цитокинов, синтез которых моноцитами и макрофагами имеет важное значение для иммунорегуляции и развития воспаления. ГК подавляют выработку так называемых «провоспалительных» цитокинов (интерлейкины 1, 6 и 8, фактор некроза опухолей), которые участвуют в механизмах иммунного ответа, влияя, в частности, на Т-клеточное распознавание антигенов. Этим цитокинам отводят большую роль в патогенезе ревматических заболеваний.

Суммарно ГК вызывают:

— торможение синтеза или снижение IgE-зависимого выхода медиаторов воспаления из лейкоцитов;

— снижение образования колоний гранулоцитов и макрофагов;

— повышение активности нейтральной эндопептидазы — фермента, разрушающего медиаторы воспаления;

— подавление опосредованной моноцитами, эозинофильными катионными белками цитотоксичности и уменьшение их содержания в бронхоальвеолярном пространстве;

— снижение проницаемости мембран (антиэкссудативное действие);

— снижение гиперреактивности гладко-мышечных клеток сосудистой стенки и бронхов;

— торможение М-холинергической стимуляции за счёт снижения количества и эффективности цГМФ.

— угнетение пролиферации фибробластов и уменьшение синтеза коллагена, что снижает темпы развития склеротического процесса.

— бронхиального цилиогенеза и восстановления повреждённого эпителия бронхов.

Воздействие на другие эндокринные органы: ингибирование продукции тиреотропного и усиление секреции соматотропного гормонов, ингибирование по механизму отрицательной обратной связи продукции АКТГ. Кроме того, ГК вызывают снижение выработки половых гормонов, которое является результатом прямого ингибирования их синтеза и уменьшения продукции лютеинизирующего гормона гипофиза. Уменьшение уровня половых гормонов рассматривается как один из факторов развития глюкокортикоидного остеопороза.

Центральные эффекты ГК включают повышение настроения, улучшение самочувствия. К другим распространённым эффектам ГК относятся увеличение двигательной активности; сохранение способности к длительным физическим нагрузкам; стимуляция секреции соляной кислоты и пепсина.

В зависимости от длительности вызываемого ГК гипоталамо-гипофизарного торможения их делят на стероиды быстрого, среднего и длительного действия. К быстродействующим кортикостероидам относятся гидрокортизон и кортизон, к стероидам

средней продолжительности действия — преднизолон, преднизон, метилпреднизолон, триамцинолон. Стероидами длительного действия являются параметазон, бетаметазон, дексаметазон. Стероиды среднего и длительного действия активны в продолжении 12–36 и 36–54 ч соответственно. Метаболическое действие синтетических кортикостероидов на тканевом уровне значительно длительнее пребывания их в крови. Так, период полураспада дексаметазона в плазме равен 200 мин, а активность его в ткани сохраняется около 3 сут. ГК с длительным тканевым периодом полураспада обычно имеют и длительный период полураспада в плазме. Кортикостероиды с пролонгированным периодом полураспада в тканях чаще вызывают побочные эффекты.

9.2.5. Эволюция топических глюкокортикоидов, применяемых в дерматологии. Топические кортикостероиды в настоящее время являются незаменимыми препаратами для лечения воспалительных и аллергических заболеваний кожи. Первым препаратом этой группы был естественный стероид гидрокортизон, который оказался безопасным, но недостаточно эффективным (особенно при тяжёлых и хронических воспалительных процессах) препаратом. В 1970-е гг. были созданы более активные галогенизированные стероиды, которые обладают сильным и очень сильным противовоспалительным эффектом. Однако, параллельно с возрастанием активности, у галогенизированных стероидов увеличилась частота и выраженность местных и системных побочных эффектов. В эти годы были получены новые данные о механизмах действия и биотранспорта стероидов, которые стали фундаментальной базой поиска новых, более безопасных, но достаточно активных препаратов топических стероидов.

Было показано, что для реализации фармакологической активности глюкокортикоид (ГК) должен взаимодействовать с мембранными и специфическими цитоплазматическими рецепторами, образуя комплекс, проникающий в ядро клетки, и регулирующий 10–20% генома компетентных клеток путём изменения процессов транскрипции. Топические стероиды взаимодействуют с глюкокортикоидными рецепторами клеток кожи. Такие рецепторы имеются на лимфоцитах, тучных клетках, моноцитах, эндотелиальных клетках, фибробластах и других клетках, участвующих в воспалительных и аллергических реакциях. ГК стимулирует синтез мРНК, которая индуцирует образование белков (например, липокортина), опосредующих различные, в том числе противовоспалительные, клеточные эффекты. Липокортин угнетает фосфолипазу A_2, подавляя высвобождение арахидоновой кислоты и синтез эндоперекисей, простагландинов, лейкотриенов, способствующих процессам воспаления и аллергии.

Противоаллергический эффект развивается также в результате торможения высвобождения из сенсибилизированных тучных клеток и базофилов гистамина и других биологически активных веществ, уменьшения числа циркулирующих базофилов, подавления развития лимфоидной и соединительной ткани, снижения количества Т- и В-лимфоцитов, тучных клеток, снижения чувствительности эффекторных клеток к медиаторам аллергии, угнетения антителообразования, изменения иммунного ответа организма. Кроме того, ГК тормозит высвобождение интерлейкина 1 и интерлейкина 2, γ-интерферона из лимфоцитов и макрофагов, уменьшает уровень гиалуроновой кислоты, стабилизирует клеточные мембраны и мембраны органелл (особенно лизосомальных), уменьшая проницаемость капилляров [2, 4, 6]. В отличие от цитостатиков, иммунодепрессивные свойства не связаны с митостатическим действием, а являются суммарным результатом подавления разных этапов иммуногенеза: миграции стволовых клеток (костного мозга), миграции В-клеток и взаимодействия Т- и В-лимфоцитов. Тормозя миграцию клеток в очаг воспаления, блокируя синтез и выделение медиаторов воспаления, тормозя пролиферацию клеток и синтез белков в очаге воспаления, ГК вызывает следующие эффекты:

— противовоспалительный — кортикостероиды устраняют экссудацию, отёк, зуд, вызывают вазоконстрикцию в месте применения, эффективны при остром, хроническом, а также аллергическом (иммунном) воспалении;

— антимитотический — кортикостероиды тормозят пролиферацию кератиноцитов и фибробластов и синтез коллагена.

Представленные сведения о многофаторности и комплексности противовоспалительных и противоаллергических эффектов ГК свидетельствуют о том, что никакие иные противовоспалительные средства, действующие на отдельные компоненты воспалительной реакции или блокирующие некоторые рецепторы медиаторов воспаления (например, антигистаминные средства или антагонисты лейкотриеновых рецепторов), не сопоставимы по своей эффективности. Применение последних оправдано лишь при развитии резистентности к ГК.

Ранее считали, что противовоспалительный, противоаллергический, десенсибилизирующий противошоковый, антитоксический и иммунодепрессивный эффекты реализуются через один рецептор и поэтому неотделимы друг от друга. Однако молекулярные механизмы действия ГК продолжают интенсивно изучаться, и были обнаружены подтипы рецепторов ГК — изоформы α и β. Так как для проявления генотропной активности ГК необходима димеризация рецепторов, ясно, что возможно образование трёх вариантов димеров и от их соотношения в различных клетках может зависеть степень развития глюкокортикоидного эффекта в той или иной ткани. Установлено, что от характера димеризации, даунрегуляции β-изоформы рецептора и репрессии фактора транскрипции NF-$\varkappa$B зависит как величина терапевтического ответа на ГК, так и развитие к нему резистентности. Было показано, что фторированные стероиды быстрее образуют димеры рецепторов ГК и быстрее вызывают апоптоз некоторых клеток, например гипоталамуса, что приводит к развитию зависимости к ГК, а производные преднизолона стимулируют образование как димеров рецепторов ГК, так и их гетеродимеров с минералокортикоидными рецепторами, способствуя развитию более мягких, физиологичных эффектов регуляции оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники или пролиферации клеток эпидермиса.

Силу противовоспалительного действия топических кортикостероидов определяют следующие факторы.

1. Внутренняя активность, т. е. способность молекулы стероида связываться и активировать глюкокортикоидный рецептор. Следующие модификации молекулы гидрокортизона повышают внутреннюю активность:

— введение двойной связи между атомами C_1 и C_2 стероидного кольца;

— добавление галогена (фтора или хлора) в позиции 6 и/или 9;

— добавление метильной группы CH_3 в положении 6 (как у метилпреднизолона);

— этерификация по C_{17}.

2. Концентрация стероида в очаге воспаления. Способность топического стероида проникать в кожу зависит от:

— липофильности молекулы; проникновение стероидов через фосфолипидные слои эпидермиса в дерму повышается с увеличением липофильности молекулы: липофильность возрастает при этерификации молекулы стероида по C_{17} и C_{21};

— лекарственной основы;

— состояния рогового слоя; роговой слой является основным барьером и резервуаром для топических стероидов.

Поступление стероидов в глубокие слои кожи увеличивается:

— при удалении рогового слоя (в клинических условиях такая ситуация наблюдается при повреждении эпидермиса в результате различных заболеваний);

— на участках кожи с тонким роговым слоем (лицо, голова, подмышечные и паховые области);

— у детей и пожилых людей;

— при некоторых способах нанесения; окклюзионная повязка и «естественная окклюзия» в складках кожи увеличивают поступление стероида вглубь кожи.

Для топических стероидов важно, чтобы при нанесении на кожу они могли бы проникнуть через роговой слой кожи и затем эффективно взаимодействовали с клеточными рецепторами для ГК, а затем, медленно проникая в кровоток, прочно связывались с транспортными белками крови, которые бы их переносили в печень для инактивации. При этом низкая свободная концентрация топического стероида в крови предотвратит развитие системного эффекта.

Местные побочные эффекты. Атрофия кожи, стрии и телеангиэктазии являются следствием антимитотического действия стероидов, которое наиболее выражено у галогенизированных препаратов. Риск развития местных побочных эффектов увеличивается при длительном использовании топических кортикостероидов.

Системные побочные эффекты. Кортикостероиды могут всасываться в системный кровоток через кожу, особенно повреждённую вследствие заболевания. В таких случаях возможно возникновение системных побочных эффектов. Обычно в кровь попадают очень незначительные количества стероида, которые не могут вызвать такие побочные эффекты как остеопороз, кушингоидный синдром или замедление роста у детей. Однако даже малые количества стероидов при попадании в системный кровоток могут подавлять систему гипоталамус–гипофиз–надпочечники, что проявляется снижением выработки эндогенного кортизола. Это особенно актуально при длительном использовании топических стероидов, а также у детей, поскольку кожа у них более тонкая (что облегчает всасывание стероида через кожу) и выше соотношение поверхность/масса тела.

Риск системного действия зависит от:

— количества стероида, всосавшегося из кожи в кровь;

— времени, в течение которого активный (свободный от связи с белками плазмы) препарат циркулирует в крови.

Максимально безопасным является стероид, который мало всасывается из кожи в кровь; циркулирует в крови преимущественно в неактивной (связанной с транскортином) форме; быстро инактивируется (путём глюкуронидизации в печени) и быстро выводится из организма. Галогенизированные стероиды медленно метаболизируются, плохо связываются с транспортным белком транскортином и медленно выводятся. Период полувыведения галогенизированных препаратов в 2–3 раза больше, чем у естественного гидрокортизона. Поэтому даже при малом всасывании через кожу галогенизированные стероиды могут оказывать системное действие, поскольку в крови может длительно циркулировать активный препарат в свободной (не связанной с транскортином) форме.

Базируясь на этих фундаментальных данных, был проведён направленный поиск топических кортикостероидов с улучшенным соотношением польза–риск, которые были бы так же эффективны, как галогенизированные, но при этом более безопасны. В 1990-е годы были созданы препараты нового поколения — «диссоциированные» кортикостероиды, для которых характерна высокая местная противовоспалительная активность при пренебрежимо малом системном эффекте (оптимальным соотношение между терапевтическими и побочными эффектами оказалось у топического стероида метилпреднизолона ацепоната, который применяется в клинической практике с 1994 г.).

Метилпреднизолона ацепонат (МПА) обладает уникальными фармакокинетическими свойствами: благодаря наличию коротких боковых цепей углеводородов в положениях C_{17} и C_{21}, его МПА имеет высокую липофильность и хорошо проникает в кожу к очагу воспаления, где создаётся его высокая концентрация. Это является необходимым условием высокой эффективности. Показано, что оптимальное проникновение че-

рез фосфолипидные слои эпидермиса в дерму обеспечивается при коэффициенте липофильности (коэффициент распределения октанол/вода) 2000–3000. Липофильность МПА значительно выше, чем у гидрокортизона и его производных, и находится в оптимальных пределах (коэффициент распределения октанол/вода — 2500).

В коже МПА гидролизуется эстеразами по положению C_{21}, в результате чего образуется высокоактивный метилпреднизолон-17-пропионат (МПП), который затем частично метаболизируется в 21-МПП и метилпреднизолон. Сродство 17-МПП к внутриклеточным глюкокортикоидным рецепторам больше, чем у МПА и гидрокортизона, соответственно в 2,4 и 6,1 раза. Кроме того, процесс биоактивации в поражённой или воспалённой коже протекает интенсивнее, чем в здоровой, поскольку эстеразная активность в очаге воспаления повышается.

Метилпреднизолон-17-пропионат абсорбируется в кровь лишь в незначительных количествах и быстро инактивируется путём глюкуронидизации. Отсутствие активного препарата в циркуляторном русле минимизирует риск возникновения нежелательного системного действия. Исследования на животных и у здоровых добровольцев показали, что, несмотря на то что МПА не содержит атомов галогенов, он относится к сильным топическим кортикостероидам. В экспериментах на животных (модель отёка уха крыс и оксазолоновый тест у мышей) эффект МПА был сравним с эффектом очень сильного галогенизированного кортикостероида клобетазола-17-пропионата и превышал эффект негалогенизированного кортикостероида средней силы гидрокортизона-17-бутирата. С помощью измерения толщины кожи у крыс было показано, что после ежедневного нанесения 10 мл раствора МПА, гидрокортизона-17-бутирата или клобетазола-17-пропионата на 1 $см^2$ кожи в течение 43 дней толщина кожи уменьшалась на 40%, 37% и 84% соответственно. Таким образом, атрофогенный потенциал МПА был таким же, как у более слабого по противовоспалительному эффекту гидрокортизона-17-бутирата и значительно ниже, чем у клобетазола-17-пропионата, который обладает такой же, как МПА, противовоспалительной активностью.

Эффективность и переносимость метилпреднизолона ацепоната в формах крема, мази и жирной мази были исследованы более чем у 3000 больных с различными зудящими или экзематозными дерматозами, в число которых, в частности, входили: контактный дерматит, дисгидроическая экзема, иритарная экзема, нумулярная (микробная) экзема, себоррейная экзема, атопический дерматит, экзема у детей.

Эти исследования продемонстрировали высокую эффективность метилпреднизолона ацепоната при лечении различных форм экзем, в том числе атопического дерматита, у взрослых и детей, сопоставимую с эффектом галогенизированных препаратов. При этом применение метилпреднизолона ацепоната связано с меньшим риском возникновения атрофии и телеангиэктазий по сравнению с некоторыми другими стероидами той же эффективности (например, мометазона фуроатом). Метилпреднизолона ацепонат не вызывает клинически значимого снижения уровня кортизола в плазме крови, чем обусловлено отсутствие у него системных побочных эффектов. При длительном применении метилпреднизолона ацепоната у пациентов с хроническими формами экзем (до 4 недель у детей и до 12 недель у взрослых) также выявлена очень хорошая переносимость.

Весьма перспективным оказалось применение метилпреднизолона ацепоната у детей, у которых около 50–75% аллергических заболеваний составляет атопический дерматит. Для этого заболевания характерно раннее начало и быстрое развитие хронических форм. Дети особенно нуждаются в быстром устранении болезненных симптомов, в первую очередь зуда, поскольку расчёсывание вызывает усиление и хронизацию воспалительного процесса. С другой стороны, вопросы безопасности кортикостероидной терапии, особенно системной, требуют у детей ещё большего

внимания, чем у взрослых. У детей существует больший риск угнетения системы гипоталамус–гипофиз–надпочечники из-за тонкой кожи и небольшой массы тела. Многие сильные галогенизированные стероиды достаточно хорошо абсорбируются через кожу, и из-за медленного метаболизма их концентрации в крови могут оказаться достаточными для подавления функции надпочечников.

При изучении эффективности крема, мази и жирной мази метилпреднизолона ацепоната в сравнительных мультицентровых исследованиях у 558 детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет, страдающих средней тяжести или тяжёлым атопическим дерматитом, было показано, что полное выздоровление или значительное улучшение имеет место у 95 детей, получавших лечение метилпреднизолоном ацепонатом. При этом переносимость метиолпреднизолона ацепоната была отличной у 98% детей. При применении метилпреднизолона ацепоната 1 раз в день он был так же эффективен, как сильные фторированные кортикостероиды бетаметазона-17-валерат или предникарбат при применении 2 раза в день.

Эффективность эмульсии метилпреднизолона ацепоната изучена в сравнительном исследовании с лосьоном гидрокортизона-17-бутирата у 145 детей в возрасте от 4 месяцев до 14 лет с различными формами острых экзем, включая атопический дерматит (длительность терапии до 2 недель). Полное выздоровление или значительное улучшение было достигнуто в 88,9% случаев при применении метилпреднизолона ацепоната 1 раз в день и в 93,2% случаев при применении гидрокортизона-17-бутирата 2 раза в день (различия статистически не достоверны).

Врачи, проводившие исследования, подчёркивали, что при лечении детей с атопическим дерматитом предпочтение следует отдавать таким лекарственным формам, как крем и эмульсия, поскольку из-за теплового окклюзионного эффекта жирной мази может усиливаться зуд, что крайне нежелательно. Кроме того, использование крема и эмульсии сопряжено с меньшим риском возникновения нежелательного системного действия, что очень важно для детей.

Таким образом, высокая эффективность и безопасность, удобство применения — всего 1 раз в день, а также наличие 4 лекарственных форм (эмульсия, крем, мазь, жирная мазь) сделали метилпреднизолоана ацепонат препаратом выбора в лечении различных форм экзем и атопического дерматита у взрослых и детей.

9.2.6. Резистентность к глюкокортикоидам: механизмы и клиническое значение. Глюкокортикоиды являются наиболее мощными и универсальными противовоспалительными препаратами, обладающими выраженной иммуномодулирующей активностью. Именно благодаря им был достигнут значительный прогресс в лечении большинства аллергических и аутоиммунных заболеваний. При лечении системной склеродермии, системных васкулитов, ревматической полимиалгии, дерматомиозитов/полимиозитов, гигантоклеточного артериита, эозинофильного фасциита глюкокортикоиды стали средствами первого ряда.

Кроме того, ГК применяются в качестве средств 1) заместительной терапии при недостаточности коры надпочечников и 2) супрессивной терапии при адреногенитальном синдроме.

Для заместительной терапии надпочечниковой недостаточности используют физиологические дозы ГК. У больных с хронической надпочечниковой недостаточностью препараты применяются пожизненно. При адреногенитальном синдроме для подавления секреции кортикотропина (и последующего снижения гиперсекреции андрогенов корой надпочечников) глюкокортикоиды применяются в терапевтических (т. е. супрафизиологических) дозах. Фармакодинамическая терапия представляет собой наиболее частый вариант клинического применения глюкокортикоидов при:

— диффузных болезнях соединительной ткани (системная красная волчанка, тяжёлое течение ревматоидного артрита, узелковый полиартериит и т. д.);

— аллергических реакциях (отёк Квинке, сенная лихорадка, крапивница, анафилактический шок и т. д.);
— болезнях почек (быстропрогрессирующий гломерулонефрит и др.);
— заболеваниях надпочечников (болезнь Аддисона);
— болезнях крови (аутоиммунная гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура и т. д.);
— болезнях лёгких (бронхиальная астма);
— заболеваниях желудочно-кишечного тракта (например, болезнь Крона, отдельные формы цирроза печени и др.);
— заболеваниях нервной системы (некоторые виды судорог);
— болезнях глаз (аллергические кератиты, конъюнктивиты и т. д.);
— заболеваниях кожи (в том числе узловатая эритема, экзема и др.);
— злокачественных опухолях (прежде всего лейкозы и лимфопролиферативные заболевания);
— отёках головного мозга различного генеза;
— некоторых инфекционных заболеваниях (туберкулёзный перикардит, пневмоцистная пневмония и др.);
— тяжёлых шоковых состояниях.

В клинической практике применяются природные ГК (кортизон и гидрокортизон) и их полусинтетические производные. Последние, в свою очередь, делятся на нефторированные (преднизон, преднизолон, метилпреднизолон) и фторированные (триамцинолон, дексаметазон и бетаметазон).

Столь широкое клиническое использование препаратов ГК основывается на существование практически во всех клетках организма специфических плазмомембранных и цитозольных рецепторов ГК, которые регулируют 10–20% генома. Исследования молекулярных механизмов функционирования рецепторов ГК (РГК), по существу транскрипционных факторов, показало их большую сложность и многофакторность. Их функционирование не всегда и не у всех происходит одинаково, что, к сожалению, иногда не позволяет достичь требуемого клинического эффекта. Исследование этой проблемы привело к формированию понятия резистентности к ГК у больных, которые не чувствительны или слабо чувствительны к препаратам ГК. В последние годы предпринимаются многочисленные усилия понять природу этой резистентности, что неизбежно обращает исследователей к более детальному изучению механизмов функционирования рецепторных систем для ГК.

Для взаимодействия ГК с цитозольными рецепторами должны правильно функционировать мебранные транспортёры для ГК. На этот процесс, как и на само взаимодействие агонистов с цитозольными рецепторами, может влиять ряд соединений: уродезоксихолевая кислота, кортивазол, тиоредоксин, карнитин, и от присутствия этих веществ, по-видимому, зависит конечный эффект ГК.

Противовоспалительное и иммуноторопное действие ГК обусловлено изменением транскрипции ряда ферментов, ответственных за образование факторов воспаления и клеточной пролиферации. Стресс-индуцированные уровни глюкокортикоидов подавляют производство интерлейкина-1-β и фактора нейроза опухолей-α, но не оказывают влияния на производство интерлейкина-6. Кроме того, циркадные вариации кортизола связаны с уменьшенным производством фактора некроза опухолей-α, но не оказывают влияния на производство интерлейкина-1-β. Устойчивость производства интерлейкина-6 к подавлению глюкокортикоидами совместима с данными, предполагающими как противовоспалительное, так и провоспалительное действие этого цитокина. Взаимодействие гормонорецепторного комплекса с ГЧЭ приводит к увеличению или снижению процессов транскрипции. Механизмы влияния стероидов на активность генов пока не выяснены. Однако не вызывает сомнения, что они

во многом определяются характером комплексообразования стероида с цитозольным рецептором и исходной структурой молекулы рецепторов. Согласно полученным в последние годы данным, эти рецепторы, во-первых, активны только в виде димеров, во-вторых, мономеры рецепторов стероидов одного класса не одинаковы, и поэтому могут существовать различные димеры, и, в третьих, мономеры рецепторов разных классов могут взаимодействовать между собой, т. е. могут образовываться гетеродимеры стероидных рецепторов, представляющие собой гетерогенные рецепторные образования. Следовательно, исследования молекулярных механизмов действия стероидных гормонов приближают к пониманию причин встречающихся в клинической практике случаев резкого изменения чувствительности больных к препаратам ГК. Резистентность к ГК наблюдается у ряда больных при фамильном/спорадическом синдроме устойчивости к ГК, ревматоидном артрите, остеоартрите, системной красной волчанке, болезни Крона, язвенном колите, септическом шоке/дыхательном дистресс-синдроме, бронхиальной астме, а повышенная чувствительность — при висцеральном ожирении с гипертонией и резистентностью к инсулину и синдроме иммунодефицита при ВИЧ-инфекции типа 1.

Межрецепторные взаимодействия как возможная причина развития резистентности к ГК. В процессе активации гормон-рецепторного комплекса и взаимодействия с ГЧЭ происходит его фосфорилирование. На него могут воздействовать и другие промоутеры и кофакторы, например белки, образующиеся при активации рецепторов фактора некроза опухолей-α и тем самым менять функционирование РКГ, что может быть одной из причин увеличение или снижения их чувствительности к ГК.

Имеются данные о том, что некоторые из цитокинов и факторов роста, относящие к медиаторам воспаления, могут играть роль в развитии резистентности к ГК. В частности, установлено, что инкубация лейкоцитов с интерлейкинами 2 и 4 или только с интерлейкином 13 сопровождается ингибированием функционирования рецепторных систем для ГК у больных бронхиальной астмой. Эти изменения включают снижение сродства ядерной фракции РГК к лиганду. Аналогичным образом фактор некроза опухолей-α вызывает развитие резистентности к ГК у мононуклеарных клеток человека. Как известно, фактор некроза опухолей-α рецепторопосредуемым образом индуцирует образование ряда специфических белков (белок, ассоциированный с протеазой, конвертиующей интерлейкин-1-β, рецепторвзаимодействующий белок и др.) и транскрипционных факторов NF-kB и AP-1, которые могут снижать транскрипционную активность путём непосредственного взаимодействия с ГК-рецепторным комплексом, приводя к ингибированию трансактивации РГК. Межбелковые взаимодействия на уровне ГК-рецепторного комплекса могут качественно/количественно менять его антитрансактивационную активность, приводя как к гиперчувствительности, так и резистентности к ГК. Вследствие сложности функционирования РГК и необходимости их димеризации в процессе функционирования можно ожидать наличие нескольких причин развития резистентности к ГК. К ним относится даун-регуляция (известная для многих рецепторов), мутации и изменение процессов димеризации и гетеродимеризации.

Даун-регуляция РГК. С помощью радиолигандного связывания было показано, что агонисты РГК могут вызывать даун-регуляцию (снижение числа) рецепторов в культивируемых клетках (At-20, *Hela*, культура лимфоцитов) и в целом организме (мозг крыс, лимфоциты человека). В большинстве случаев количество РГК снижалось на 50% и более. Аналогичные результаты были получены с помощью антител против РГК (метод вестерн-блоттинга), как *in vitro* (клетки гепатомы крыс и фибробластов NIH-3T3 мышей), так и *in vivo* (печень крыс, где уровень РГК снижался на 60–80% через 24 ч после введения дексаметазона). В то же время

в некоторых случаях (лейкемические Т-лимфоциты линии CEM-C7 человека, клетки миеломы линии OPM-2 человека и клетки тимомы линии WEHI-7 мышей) воздействие агонистов РГК приводит к увеличению экспрессии их рецепторов.

Даун-регуляция РГК обусловлена снижением их транскрипции (уменьшение синтеза матричной РНК и соответствующее снижение количества белка РГК). Данный эффект ГК может быть связан с репрессией активности промоутера РГК и каких-то других областей генома. Имеются данные о том, что последовательность генома, кодирующая аминокислотные остатки РГК 550–697, играет важную роль в даун-регуляции α-субъединицы РГК.

Кроме влияния на транскрипцию, ГК могут снижать стабильность иРНК для рецепторов ГК (эффекты дексаметазона в клетках At-20 или трансфекционных клетках COS-1). Но в клетках гепатомы крыс или лимфоцитах человека такого эффекта ГК не обнаружено.

Интересно отметить, что даун-регуляцию РГК могут вызывать не только агонисты, но и антагонисты. Так, например, антагонист RU38486, связывание которого с РГК не приводит к заметной трансактивации, вызывал такую же даун-регуляцию РГК, как и агонист дексаметазон.

Наконец, причиной даун-регуляции может быть и снижение стабильности белка рецептора ГК. Уменьшение времени полужизни рецепторного белка было выявлено в клетках GH1, COS-1 и гепатомы. Поскольку протеосомный ингибитор MG132 ингибирует индуцируемую дексаметазоном даун-регуляцию РГК, можно считать, что в деградации рецепторного белка принимает участие протеосомный комплекс. Так как мутация лизинового остатка N-концевой области РГК приводит к исчезновению у дексаметазона способности вызывать даун-регуляцию РГК на уровне его экспрессии, следует полагать, что наиболее чувствительный к деградации участок рецепторного белка находится именно в этой области. По-видимому, дуан-регуляция — это способ клеток по обратной связи регулировать собственную чувствительность к ГК. Пока этот способ регуляции изучается только в научных лабораториях, и полученные знания ещё не используются в клинике. Однако понимание механизмов изменения чувствительности клеток-мишеней к ГК имеет большое практическое значение, так как его оценка необходима для правильного индивидуального дозирования препаратов ГК и определения обоснованной частоты приёма этих препаратов, с тем чтобы восприимчивость клеток к ним была максимальна.

Мутации рецепторов ГК. С проблемами вариабельности и гетерогенности РГК, ведущих к развитию резистентности к ГК, в ряде случаев связано такое явление, как мутации генов, кодирующих белки этих рецепторов. При изучении семейной глюкокортикоидной резистентности была обнаружена точечная мутация РГК (замена аспарагиновой кислоты в участке 641 на валин), которая привела к уменьшению связывания дексаметазона с РГК в 3 раза. Ещё один пример — гомозиготная точечная мутация аминокислотного остатка в 39-м положении (замена валина на изолейцин), сопровождающаяся снижением аффинитета РГК и его трансактивационной активности. Показано, что гетерозиготная мутация Т–Ц в нуклеотидной позиции 2318 (экзон 9) гена, кодирующего α-субъединицу РГК, приводит к замене лейцина пролином в 773-м положении домена рецепторного белка, ответственного за связывание лиганда. В результате этой мутации сродство ГК к α-субъединице уменьшилась в 2,6 раза и замедлилась транслокация гормон-рецепторного комплекса в ядро с 12 до 30 мин. Всего случаев мутацией РГК описано около 10 и по-видимому, частота этих мутации не так высока, чтобы такая причина резистентности к ГК могла иметь широкое клиническое значение.

Таким образом, резистентность к ГК имеет множественные причины. Она может быть функциональной и связанной либо с характером воспаления (медиаторы воспаления индуцируют образование белков, ингибирующих функцию РГК), либо с концентрацией агониста, т.е. уровня самого ГК (отрицательная обратная связь). Теоретически уменьшить эту резистентность можно путём снижении дозы ГК и уменьшения частоты его введения. Эта проблема требует клинического изучения. Сложнее обстоит дело, если резистентность обусловлена мутацией гена РГК, так как пути генной терапии, позволяющие восстановить чувствительность к ГК, ещё не разработаны. При наличии резистентности к ГК в любом случае следует искать другие способы фармакотерапии. В частности, имеются данные об успешности лечения идиопатической интерстициальной пневмонии у больного с резистентностью к ГК с помощью циклофосфамида или нефротического синдрома при такой же резистентности с помощью ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (римаприла) или блокатора кальциевого канала (верапамила).

9.2.7. Перспективы создания селективных лигандов рецепторов ГК. Ранее считали, что противовоспалительный, иммунодепрессивный и метаболические эффекты ГК реализуются через один тип рецепторов и поэтому не отделимы друг от друга. В то же время известно, что метаболические эффекты ГК реализуются преимущественно через процессы трансактивации (стимуляция синтезов ферментов и др.), в то время как иммуносупрессивное действие, в основном, — через процессы трансрепрессии. Если для трансактивации необходима димеризация рецепторов и взаимодействие лиганд-рецепторных комплексов с ДНК, то процессы трансрепрессии не нуждаются в димеризации. Отделить метаболические эффекты от противовоспалительных можно путём заменой аминокислоты в цинковом пальце, которая блокирует возможность димеризации рецепторов. У мышей с таким «дефицитным по димеризации» рецептором глюкокортикоидов классические кортикостероды (дексаметазон) проявляют исключительно иммуносупрессивное действие, без проявления метаболических (нарушение обмена глюкозы, липидов, Ca^{2+}) эффектов.

Поиск лигандов ГР диссоциированного действия (преимущественно влияющих на процессы трансрепрессии) привели к созданию ряда веществ стероидной и нестероидной структуры, обладающих перспективными для клинической практики свойствами. Первыми диссоциированными лигандами были стероидные соединения RU24782, RU24858, RU40066, которые с высоким аффинитетом связываются с ГР, блокируют активность AP-2 и NF-$\varkappa$B и имеют малый трансактивационный потенциал. Другие лиганды (AI-438 и ZK 216348 — нестероиды) продемонстрировали улучшенный терапевтический профиль (меньше побочных эффектов), но не полную диссоциацию трансактивации от трансрепрессии. Эти соединения проявляют противовоспалительную активность, сравнимую с таковой преднизолона, на модели астмы (животные), при этом не влияют на уровень глюкозы в крови и имеют меньший остеопоретический потенциал.

9.3. Действие стероидных гормонов на сердечно-сосудистую систему

Действие кортикостероидов на сердечно-сосудистую систему (ССС) связано в основном с изменением почечной экскреции натрия. Кроме того, ГК изменяют чувствительность сосудистой стенки к вазоактивным веществам (повышение уровня адренорецепторов в гладко-мышечном слое сосудистой стенки, усиление прессорного действия ангиотензина-II). Гиперкортицизм (эндогенный, экзогенный) сопровождается развитием артериальной гипертонии, не чувствительной к низкосолевой диете.

ГК уменьшают проницаемость капилляров, поддерживают нормальный тонус артериол, сократимость миокарда. Недостаточность коры надпочечников характеризуется низким сердечным выбросом, расширением артериол, слабой реакцией на адреналин. В сочетании с гиповолемией, вызванной дефицитом минералокортикоидов, эти изменения могут вести к сосудистому коллапсу.

При избытке альдостерона развивается гипертензия, вследствие задержки натрия и воды. Возможны также гипокалиемия, отёки и гиперосмолярная кома. Поэтому при избытке альдостерона оправдано применение его антагониста — спиронолактона.

Однако препараты кортикостероидов или их антагонистов пока не находят широкого клинического применения, по-видимому из-за отсутствия необходимых исследований. В то же время в последние годы гораздо больше данных было получено об особенностях действия на ССС половых стероидных гормонов, причём в организме женщины. У мужчин влияние андрогенов на функции ССС изучено ещё недостаточно, хотя есть все основания полагать, что такое влияние существует, так как мужские половые гормоны играют жизненно важную роль в поддержании многих функций мужского организма и оказывают биологическое действие практически на все его ткани. Тестостерон — основной андрогенный стероид — синтезируется преимущественно в тестикулах. Надпочечники продуцируют значительно меньше собственно тестостерона, но обеспечивают высокий уровень дигидроэпиандростерона сульфата (в 100 раз больше, чем тестостерона), который конвертирует в тестостерон в периферических тканях.

Суммарный эффект тестостерона слагается из эффектов дигидротестостерона и эстрадиола (его активных метаболитов). Соответственно эффекты тестостерона принципиально можно разделить на реализуемые через рецепторы андрогенов и эстрогенов. У андрогенов выявлены значительные анаболические эффекты, выражающиеся в поддержание мышечной массы (в том числе в миокардиоцитах), стимуляции синтеза органоспецифических белков в почках, печени, сальных и потовых железах. Кроме того, андрогены регулируют гемопоэз, стимулируя выработку эритропоэтина в почках, и посредством этого — эритропоэз в красном костном мозге.

Основанием для повышения внимания к роли женских половых гормонов (эстрогенов и гестагенов) в патологии ССС стали данные эпидемиологических исследований, согласно которым в частоте ССС имеются выраженные половые различия. У женщин до менопаузы частота заболеваний ССС значительно ниже, чем у мужчин, но после менопаузы, когда у женщин резко уменьшается уровень эстрогенов, это различие исчезает. Смерть от ишемической болезни сердца (ИБС) наступает чаще у женщин с преждевременной менопаузой (до 40 лет) по сравнению с контрольной группой того же возраста. В настоящее время является общепризнанным, что терапия эстрогенами оказывает множественные благоприятные эффекты, включая изменения профиля липидов и липопротеинов, углеводного обмена, прямое влияние на гемодинамику и эндотелий сосудов.

Значительное влияние наступления менопаузы на состояние здоровья всё возрастающей популяции женщин способствовало увеличению числа исследований и лучшему пониманию различных аспектов этого феномена, а также последующих воздействий на состояние здоровья населения в целом. Более глубокое понимание биологии и физиологии менопаузы способствовало разработке методов профилактики и лечения с целью предотвращения развития некоторых неблагоприятных последствий её наступления. Если раннее заместительная гормональная терапия была во многом эмпирической, то в настоящее время разработаны гормональные препараты и их дозовые режимы, которые в точности соответствуют физиологическим потребностям женщины.

В большинстве развитых стран мира менопауза, в зависимости от возраста менархе, времени рождения первого ребёнка и ряда других причин, чаще наступает в возрасте между 45 и началом 50-й декады. Число родов, средняя продолжительность менструального цикла и курение также могут оказать влияние на возраст наступления менопаузы.

Постменопауза — последняя фаза периода климактерия, началом которого является менопауза. Эндокринные характеристики постменопаузы и более позднего возрастного периода резко отличаются от репродуктивного периода. Образование эстрогенов и прогестерона является низким, уровень ФСГ и ЛГ увеличивается, достигая своего пика через 2–3 года после наступления менопаузы, после чего начинает постепенно снижаться.

Повышение концентрации ФСГ и ЛГ происходит вследствие прекращения ингибирования их образования по обратной связи, которое имело место в репродуктивном возрасте. Поскольку снижается число фолликулов, яичники теряют способность отвечать на гонадотропную стимуляцию и продуцировать значительное количество эстрогенов, прогестерона или ингибина. Для ФСГ главным фактором обратной связи является ингибин, поэтому в результате резкого снижения содержания этого ингибитора происходит сильное увеличение уровня ФСГ.

В постменопаузе уровни андрогенных предшественников — андростендиона и тестостерона, в репродуктивном периоде образующихся в яичниках и надпочечниках, значительно меняются. Андростендион более не продуцируется в яичниках и его содержание в сыворотке достигает 50% от того уровня, который отмечался в репродуктивный период. Что касается тестостерона, то благодаря повышению образования андрогенов интерстициальными клетками под влиянием возросшего уровня гонадотропинов, отмечается тенденция к увеличению его секреции. В результате снижения содержания эстрогенов уменьшается концентрация глобулина, связывающего половые стероиды (ГСПС), что в свою очередь способствует увеличению фракции свободного тестостерона.

Таким образом, уровень эстрогенов снижается более значительно по сравнению с содержанием андрогенов. Повышением соотношения андрогены/эстрогены с наступлением менопаузы объясняется появление некоторых признаков и симптомов, определяемых термином «относительная гиперандрогения».

Большинство женщин отмечает начало климактерия как появление одного или нескольких симптомов или нарушений, которые обычно подразделяют на транзиторные и долговременные.

Около 80% женщин развитых стран мира в период перименопаузы и ранней постменопаузы испытывают острые транзиторные симптомы, такие как приливы жара, ночную потливость, которые обычно ассоциируются с периодом климактерия (но не обязательно являются специфическими) (табл. 9.2). По своей природе эти симптомы могут быть вазомоторными или психологическими.

Таблица 9.2

Транзиторные симптомы, характерные для женщин 45–54 лет

Вазомоторные	Психологические	
Приливы жара Ночная потливость Учащённое сердцебиение	Бессонница Снижение памяти Неуверенность в себе Лабильность настроения Тревожность Снижение либидо	Снижение концентрации внимания Трудности при принятии решений Снижение энергии и побуждений Раздражительность Плаксивость

Помимо характерных изменений менструальной функции, климактерий часто, но не всегда, сопровождается появлением вазомоторных симптомов, таких как приливы жара, потливость и сердцебиение различной степени выраженности.

Приливы жара могут быть субъективно крайне неприятными, часто повторяющимися и длятся от нескольких секунд до 30 мин (в среднем 4 мин). Обычно они возникают без всякой внешней причины, хотя горячее питьё, еда и одевание могут провоцировать их появление. В начальной «продромальной» фазе уровень адреналина в сыворотке крови повышается и частота сокращений сердца повышается приблизительно на 20 ударов в минуту (сердцебиение). Через 30 с начинает снижаться уровень норадреналина, что приводит к вазодилатации и повышению кровотока в коже лица, предплечий и рук. Возможно, в этот процесс вовлечены пептиды, кодируемыми геном, сходным с геном кальцитонина. Они обладают мощным сосудорасширяющим действием. После чего следует потоотделение, иногда профузное, что значительно увеличивает чувство дискомфорта у женщины.

Эстрогены и прогестагены также вовлечены в эти процессы, поскольку многие женщины в пери- и постменопаузе страдают от приливов жара, а использование заместительной гормональной терапии купирует эти симптомы. Хотя приливы жара являются наиболее характерными и отмечаются почти у 50% женщин белой расы, они не являются универсальными для женщин других рас. Например, более 80% японок не отмечают этих симптомов или не придают им значения как чему-то патологическому.

Эстрадиола валерат предупреждает также развитие атеросклероза, благодаря положительному воздействию на липидный профиль, а именно увеличению уровня холестерина ЛПВП и снижению уровня холестерина ЛПНП и общего холестерина.

Риск коронарной болезни сердца у женщин в пременопаузальном периоде ниже, чем у мужчин. Однако в постменопаузальной фазе он возрастает. У женщин, находящихся в фазе постменопаузы, частота коронарной болезни выше, по сравнению с женщинами такого же возраста в пременопаузальном периоде.

Этиология сердечно-сосудистой патологии сложна и недостаточно изучена, однако высокий уровень липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в плазме крови издавна связывают с развитием атеросклероза. Высокий уровень ЛНП в плазме является наиболее серьёзным фактором коронарной болезни сердца. В этой связи интересно отметить, что в возрастных группах до 50 лет уровень ЛНП в сыворотке крови у женщин ниже, чем у мужчин. К моменту менопаузы это соотношение изменяется. Эпидемиологическими исследованиями установлено, что у лиц с низким уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в плазме крови риск коронарной болезни выше по сравнению с группами, имеющими показатели ЛВП в пределах нормы.

Положительное действие эстрогенов на сердечно-сосудистую систему в значительной степени может быть также обусловлено их кальцийантагонистической активностью. A. O. Mueck и др. (1996) показали, что 17-β-эстрадиол в концентрации 10^{-6} и 10^{-7} М ингибирует вход кальция в мышечные клетки сосудов человека. Эстрон, эстриол, 17-α-эстрадиол таким действием не обладают, что указывает на специфичность указанного эффекта 17-β-эстрадиола. Изменение частоты и выраженности сосудистых расстройств нередко рассматривается как основной критерий эффективности заместительной гормональной терапии. В последние годы продолжают проводиться экспериментальные исследования, направленные на доказательства целесообразности использования эстрогенов для прорфилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

У овариэктомированных крольчих, находящихся на холестериновой диете (0,5%), введение эстрадиола валерата приводит к значительному снижению толщины интимы артерий и к увеличению толщины эндометрия в 3 раза. Совместное введение с эст-

рогеном оксипрогестерона капроата не влияло на его антисклеротическое действие, но уменьшало его способность вызывать гиперплазию эндометрия в 3 раза. Сам по себе гестаген не влиял на размер атеросклеротических бляшек в аорте у экспериментальных животных. Эти данные подтверждают целесообразность проведения комбинированной эстроген-гестагенной терапии для профилактики атеросклероза.

В экспериментальных условиях установлена способность природных эстрогенов и их синтетических аналогов, содержащих нитро-группу, уменьшать размеры экспериментального инфаркта миокарда у крыс. В механизмах данного кардиопротективного действия эстрогенов может иметь значение способность эстрогенов ингибировать перекисное окисление липидов биомембран.

Следует отметить, что существуют половые различия в способности эстрадиола вызывать расширение сосудов и увеличивать сердечный выброс: у самок крыс эти эффекты эстрадиола были выражены значительно сильнее, чем у самцов, хотя половых различий в количестве эстрогенных рецепторов в эндотелии или мышцах аорты не выявлено.

В действии эстрогенов на ССС в качестве вторичного посредника принимает участие оксид азота, который непрерывно образуется в организме человека и животных. Основной фермент биосинтеза оксида азота — NO-синтетаза (NOS). Предполагаемая суммарная реакция записывается следующим образом:

$$2\text{L-аргинин} + 3\text{НАД(Ф)Н} + 4O_2 + 3H^+ \rightarrow \text{N-OH-L-аргинин} \rightarrow$$

$$\rightarrow 2\text{L-цитрулин} + 2NO + 3\text{НАД(Ф)}^+ + 4H_2O.$$

Различают конституциональную NOS (cNOS) и индуцибельную NOS (iNOS). Первый фермент всегда представлен в клетках, второй может быть индуцирован под действием целого ряда факторов: бактериального липополисахарида, интерферона-γ, интерлейкина-1-β и других. Фактор роста опухолей-β, белок p53, а также избыток NO ингибируют индукцию трансляции iNOS с ДНК. В нормальных клетках эстрогены стимулируют экспрессию iNOS, а в ряде опухолевых клеток (например, клетки рака молочной железы) они угнетают эту экспрессию. Данный механизм связан с ассоциацией комплекса эстроген — цитозольный рецептор с ДНК. По всей видимости, угнетение трансляции может быть связано с изменением рецепторов в опухолевых клетках вследствие мутаций.

Возможное участие некоторых рецепторов физиологически активных в регуляции активности NOS представлено на рис. 9.2. Доказано, что эстрогенные рецепторы, рецепторы к интерлейкину-1, NMDA-глутаматные рецепторы активируют, а ангиотензиновые рецепторы 1-го типа, М-холинорецепторы, угнетают синтез NO. В норме эстрогенные рецепторы и рецепторы к интерлейкину-1 стимулируют экспрессию NOS, а ангиотензиновые рецепторы 1-го типа подавляют её. Механизм влияния других рецепторных систем не известен; возможно, он связан с регуляцией активности кальциевых каналов: увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к активации NOS, так как кальций является одним из кофакторов для этого фермента (рис. 9.2).

В сердечно-сосудистой системе основная роль NO связана с вазодилатацией и торможением процесса агрегации и адгезии тромбоцитов. Тем самым оксид азота выступает в качестве вещества, улучшающего микроциркуляцию за счёт расслабления гладких мышц сосудов и улучшения реологических свойств крови. Кроме того, оксид азота ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток, предотвращает хемотаксис моноцитов, подавляет адгезию лейкоцитов на эндотелиальных клетках, предотвращая тем самым развитие атеросклеротических бляшек. У кроликов, получающих гиперхолистериновую диету, введение L-аргинина в 4 раза подавляло актив-

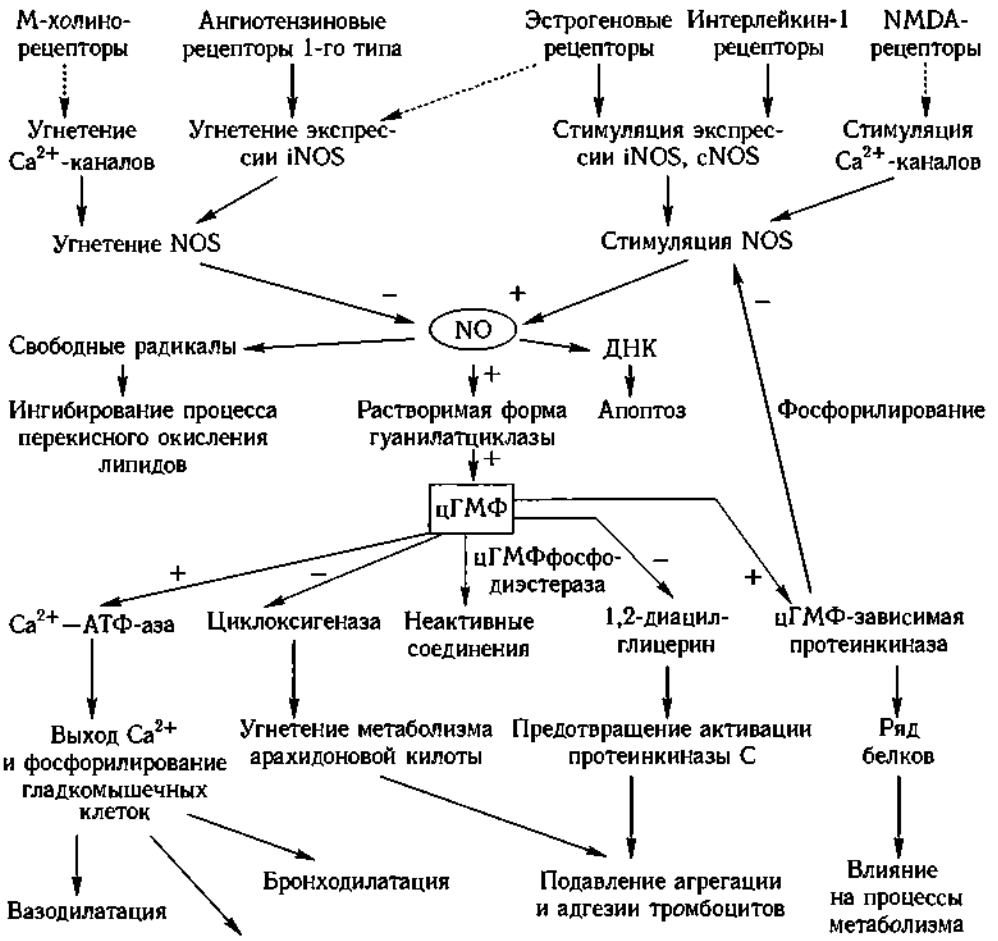


Рис. 9.2. Участие некоторых рецепторов физиологически активных веществ в регуляции синтеза NO и основные механизмы действия оксида азота: «+» — стимуляция, «−» — подавление. Сплошная стрелка означает, что данный механизм точно установлен, пунктирная означает предполагаемый механизм

ность атеросклеротических процессов. Подобным действием обладает нитропурссид, высвобождающий NO. В тоже время ингибитор синтеза NO (N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир) приводит к более быстрому развитию атеросклероза у кроликов с атерогенной диетой.

Другая функция NO связана с цитопротекторным действием. Недостаточный синтез оксида азота приводит к свободнорадикальному повреждению мембран клеток, развитию атеросклероза. В то же время избыточный синтез NO приводит к апоптотической гибели клеток. Лишь концентрация оксида азота порядка нескольких наномолей оказывается оптимальной для процесса жизнедеятельности клеток.

Подтверждением роли холинергической системы в регуляции обмена оксида азота при ряде патологических процессов служат данные об угнетении синтеза NO при курении. Активность NOS снижается даже после одной сигареты. Уменьшение интенсивности синтеза оксида азота может быть одним из механизмов развития

бронхоконстрикции у хронических курильщиков. По всей видимости, снижение активности NOS сопряжено с активацией никотином холинергической системы.

При бронхиальной астме, хроническом обструктивном бронхите синтез NO снижен, что связано с угнетением NOS. Недостаточная продукция оксида азота обусловливает спазм гладкой мускулатуры бронхов, опосредует развитие бронхоспазма.

В последние годы активно изучается роль оксида азота в развитии многих аутоиммунных заболеваний. В частности, показано, что при рассеянном склерозе, энцефаломиелите, системной красной волчанке наблюдается увеличение активности iNOS клеток макрофагального ряда, которые могут оказывать токсическое воздействие на клетки организма, вызывая их повреждение. Кроме того показано, что при рассеянном склерозе макрофаги с избыточной продукцией NO вызывают повреждение гематоэнцефалического барьера, приводя к увеличению его проницаемости. Отмечено, что чрезмерное количество NO также синтезируется нейрональными клетками при рассеянном склерозе и энцефаломиелите. Это может приводить к их апоптозу. Характерно, что по мере прогрессирования заболевания наблюдается увеличение синтеза оксида азота. При этом концентрация NO нарастает как в крови, так и в ликворе.

Интересно отметить также и тот факт, что с возрастом в большинстве клеток наблюдается угнетение активности NOS. В частности, у лиц старше 75 лет уровень NO в крови в 3–4 раза ниже, чем у лиц 25–30-летнего возраста.

Можно предположить, что снижение активности синтеза оксида азота является одним из физиологических механизмов старения организма. Возрастное угнетение активности NOS приводит к уменьшению синтеза NO. Снижение концентрации оксида азота приводит к вазоконстрикции (в результате повышается риск развития артериальной гипертензии), к свободнорадикальному повреждению мембран клеток (в том числе к развитию атеросклероза), к снижению противоопухолевой и противоинфекционной активности иммунной системы, к угнетению сексуальной функции.

Приведённые факты иллюстрируют важную роль оксида азота в функционировании многих систем организма и подчёркивают целесообразность изучения возможностей фармакологической регуляции уровня оксида азота в различных тканях.

Активация эстрогенных рецепторов стимулирует трансляцию iNOS с ДНК, усиливает синтез NO. Установлено, что в эндотелиальных клетках наблюдается прямо пропорциональная корреляция между числом эстрогенных рецепторов и концентрацией NOS. Доказано, что концентрация стабильных продуктов окисления NO в крови возрастает при физиологическом или медикаментозном увеличении концентрации эстрогенов. Так, в позднюю секреторную фазу концентрация оксида азота больше, чем в пролиферативную фазу менструального цикла. У женщин с нормально протекающей беременностью наблюдается увеличение концентрации NO по сравнению с небеременными женщинами, тогда как развитие эклампсии приводит к снижению концентрации оксида азота. Назначение эстрогенной гормонозаместительной терапии во время менопаузы приводит к повышению концентрации NO в сосудистой стенке по сравнению с нелеченными пациентками. Доказательством роли эстрогенов в синтезе оксида азота служат также данные о том, что базальный синтез NO выше у кроликов женского пола с нормальной репродуктивной функцией, чем у кроликов мужского пола или овариоэктомированных кроликов.

Увеличение концентрации оксида азота обусловливает вазодилатирующий, противоагрегантный, противоадгезионный и противотромботический эффекты эстрогенов.

Однако следует отметить, что указанные эффекты эстрогенов не всегда имеют место. Известно, при длительном применении эстрогенных препаратов может развиваться тромбоз. Показано, что при длительном (до 3 мес) добавлении к пище овариэктомированных крыс 17-β-эстрадиола (100 мг на 1 кг) снижается синтез NO

и повышается способность тромбоцитов к агрегации. Данный механизм может быть связан с ингибированием активности NOS. Так, в эксперименте *in vitro* было показано, что при инкубации с 17-β-эстрадиолом, 1-часовая инкубация стимулирует, а 6-часовая инкубация угнетает экспрессию iNOS в аорте крыс. Причина такого бифазного действия эстрогенов на NOS пока не ясна Возможно, она связана с изменением свойств эстрогенных рецепторов, с разобщением эстрогенных рецепторов с системой тарнсдукторов (вторичными мессенджерами), с истощением систем синтеза, сопряжённых с NO, совместным действием указанных факторов или другими причинами. Именно такое изменении действия эстрогенов может быть причиной неэффективности заместительной гормональной терапии (ЗГТ) в поздней менопаузе. Наиболее вероятным представляется предположение о разобщении эстрогенных рецепторов с «типичными» вторичными мессенджерами и их сопряжение с «атипичными» мессенджерами. Таким образом, вопросы изучения влияния эстрогенов на NO подлежат дальнейшему изучению. Особенно необходимо изучение зависимости эффектов эстрогенов от возраста и выяснение механизмов развития двухфазного действия этих препаратов.

В последние годы продолжаются исследования роли эстрогенов и гестагенов в регуляции функции сердечно-сосудистой системы и обсуждается целесообразность ЗГТ в пери- и постменопаузе. Причиной этому послужило отсутствие предполагаемых положительных эффектов от ЗГТ у женщин в постменопаузе в отношении защиты от сердечно-сосудистых заболеваний в ряде исследований и особенно в исследовании WHI (в этом исследовании эстрогены начали впервые применять у женщин в поздней постменапаузе, средний возраст был 63 года) [1]. В более ранних исследованиях наблюдалось положительное влияние ЗГТ на параметры функционирования сердечно-сосудистой системы у более молодых женщин с выраженными перименопаузальными симптомами.

Остаётся неясным, существует или нет критический временной интервал, после которого лечение гормонами не будет сопровождаться кардиопротекторными эффектами и какова должна быть продолжительность ЗГТ, чтобы она приносила положительные результаты.

Обоснованием эффективности влияния эстрогенов на сердечно-сосудистую систему является присутствие в её клетках α- и β-эстрогенных рецепторов [2]. Первые присутствуют в гонадах, репродуктивном тракте, молочных железах, сердечно-сосудистой системе и головном мозге. Изучение эффектов эстрогенов у мышей с врождённым отсутствием α-рецепторов позволило предположить существование другого типа эстрогенных рецепторов. Вскоре были открыты β-рецепторы, которые кодируются другим геном и представляют собой белок, отличный от α-рецепторов [3]. Однако связывающие домены α- и β-рецепторов имеют высокую степень гомологии (60%), и эстрадиол имеет одинаковое сродство к ним. В то же время фитоэстрогены имеют большее сродство к β-, чем к α-рецепторам. Оба типа рецепторов найдены в сердечно-сосудистой системе: они регулируют активность генов, кодирующих белки, которые принимают участие в клиренсе липидов, формировании тонуса сосудов, сократимости миокарда и клеточной пролиферации. α-Рецепторы локализованы в эндотелиальных клетках, причём не только в ядре, но и на поверхности клетки; показано их участие в индукции синтазы окиси азота (NO обладает сосудорасширяющим, антиагрегационным и антипролиферативным действием). Есть предположение, что в результате взаимодействия эстрогенов с α-рецепторами на поверхности эндотелиальной клетки происходит увеличение концентрации ионов кальция внутри клетки. Это приводит к активации комплексом кальмодулин-кальций активности синтазы окиси азота. Однако клонированные α-рецепторы имеют только одну гидрофобную область, с которой и происходит связывание эстрогена. Нет оснований считать, что

эти рецепторы могут находиться внутри мембраны — вероятнее, они могут быть локализованы вблизи неё, образуя с ней гликозидную связь, и таким образом регулировать функцию мембранных белков, ответственных за передачу молекулярного сигнала внутрь клетки. Хотя механизм функционирования мембранных рецепторов эстрогенов ещё не ясен, следует подчеркнуть, что есть данные (отсутствие стимуляции транскрипции, ингибирование антагонистами эстрогенных рецепторов), свидетельствующие о наличии быстрых негеномных (< 10 мин) эффектов эстрогенов, сопровождающихся высвобождением NO [4]. Кроме того, действуя путём активации транскрипции, комплекс эстроген — цитозольный α-рецептор может индуцировать биосинтез NO-синтазы, реализуя геномный механизм повышения уровня NO.

В противоположность действию на эндотелиальные клетки, влияние эстрогенов на изолированные артерии нельзя предотвратить антагонистами эстрогенных рецепторов или ингибиторами NO-синтазы. Можно полагать, что расслабляющее действие эстрогенов на клетки сосудов обусловлено их прямым взаимодействием с поверхностью клетки, приводящем к снижение кальциевой проницаемости. Доказательством отсутствия опосредуемого рецептором действия в этом случае служат данные о том, что 17-α-эстрадиол и 17-β-эстрадиол одинаково расслабляют стенку артерии. Несмотря на то что роль α- и β-эстрогенных рецепторов остаётся дискуссионной, интересно отметить, что β-рецепторы в наибольшем количестве присутствуют в гладкомышечных клетках артерий женщин, а у мужчин в равной степени эти клетки содержат α- и β-рецепторы. При атероматозе способность эстрогенов ингибировать пролиферацию мышечных клеток уменьшается, вероятно, вследствие повышения метилирования гена эстрогенных рецепторов [5]. Потенциально снижение экспрессии эстрогенных рецепторов уменьшает способность эстрогенов оказывать положительное влияние на сердечно-сосудистую систему. Такая локальная патология рецепторов эстрогенов может быть причиной снижения положительного действия эстрогенов у женщин в преклонном возрасте, зарегистрированного в исследовании HERS [6].

Эстрадиол, прогестерон, тестостерон и дигидротестостерон имеют специфические участки связывания в миокардиальных волокнах предсердия и желудочков, а также в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов людей и приматов [7]. Специфические насыщаемые рецепторы для эстрогенов, андрогенов и глюкокортикоидов обнаружены в коронарных артериях собак; прогестероновые рецепторы в них индуцировались физиологическими концентрациями эстрадиола [7]. Экспрессия прогестероновых рецепторов также выявлена на фетоплацентарных сосудах у людей [7]. Экспрессия α- и β-рецепторов эстрогенов в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов изменяется и зависит от патологии и концентрации эстрадиола. Ароматаза, катализирующая образование эстрогенов из андрогенов, найдена в венозной и артериальной стенках [7]. Поскольку лечение мужчин ингибиторами ароматаз приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, которая исчезает после прекращения такого лечения, можно полагать, что сосудистой ароматозе принадлежит важная роль в регуляции двигательной активности вен.

Важно отметить, что для реализации ангиотпротекторного действия эстрогенов необходимо присутствие коактиваторов эстрогенных рецепторов, в частности коактиватора SRC-3. У мышей с отсутствием гена SRC-3, при моделировании сосудистой патологии путём перевязки сонной артерии, ингибирование эстрогенами клеточной пролиферации, стимулируемое после овариэктомии, снижается [8].

Клетки миокарда человека и животных также содержат андрогенные рецепторы, которые опосредуют гипертрофический ответ тестостерона [7]. При заболеваниях сердца экспрессия адрогенных рецепторов повышается, а тестостерон может изменять экспрессию специфических рецепторов в сердце. Поэтому изменение специ-

фического метаболизма стероидов в сердце (снижение образования эстрогенов из тестостерона) может быть причиной патологической кардиальной гипертрофии.

Электровозбудимые свойства сердца также находятся под регулирующим влиянием стероидных гормонов. У женщин обычно меньше частота сердечных сокращений, вследствие различия во внутренней активности синусового узла. Это различие проявляется при рождении, когда новорождённые мальчики имеют исходно более низкую частоту сокращений сердца, чем девочки. Интервал QT длиннее у женщин, чем у мужчин, и женщины вследствие этого более чувствительны к тахикардии, вызываемой некоторыми лекарственными средствами. Частота сокращений сердца сильнее уменьшается во время менструации, чем в период фолликулярной или лютеальной фаз цикла. Эпизоды спонтанной тахикардии увеличиваются при высоком уровне прогестерона и уменьшаются при высоком уровне эстрадиола. Тяжёлые предсердные и желудочковые аритмии более часто наблюдаются у женщин, особенно суправентрикулярные тахикардии и желудочковые тахикардии, вызванные удлинением реполяризации миокарда. Влияние гормонов на ионные каналы также характеризуется половыми различиями. Даун-регуляция кальциевых каналов L-типа опосредована активацией эстрогенных рецепторов. Обнаружено, что эстрадиол также уменьшает ток калия и удлиняет период реполяризации, а андрогены укорачивают реполяризацию у мышей [7].

Тестостерон индуцирует экспрессию андрогенных рецепторов и транспортёра Na/Ca в изолированных миоцитах желудочка крыс. Миоциты сердца самцов крыс по сравнению с самками сильнее стимулируются β-адреномиметиками, вызывающими увеличение тока кальция [7].

В последние годы после выявления способности эстрогенов регулировать функции сердечно-сосудистой системы и оказывать защитное действие, препятствуя возникновению сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в постменопаузе, продолжаются исследования возможных механизмов кардиотропных эффектов женских половых гормонов.

Согласно современным представлениям существуют несколько механизмов защитного влияния эстрогенов на сердечно-сосудистую систему: благоприятное влияние на липиды плазмы (ингибирование перекисного окисления липидов, обращение отрицательных изменений липидного профиля при менопаузе — увеличение уровня холестерина липидов высокой плотности и снижение уровня липидов низкой плотности), углеводный обмен (увеличение печёночного клиренса инсулина, ответа на инсулин и снижение толерантности к глюкозе), систему гемостаза (увеличение фибринолитической активности без изменения коагуляции), артериальное давление (уменьшение гипертонии), сосудистое сопротивление и скорость кровотока (острое и хроническое введение эстрогенов повышает периферический кровоток и снижает периферическое сопротивление сосудов, в том числе коронарных), ингибирование гиперплазии эндотелия [9].

При этом важно подчеркнуть, что положительное влияние эстрогенов на сердечно-сосудистую систему может зависеть от пути их введения. Так, пероральное введение может увеличивать синтез факторов коагуляции и воспаления, что не наблюдается при их парантеральном введении. В частности, с нашей точки зрения, наиболее перспективным является использование трансдермальных систем эстрогенов (к одной из лучших подобных лекарственных форм относится пластырь Климара).

Сосудорасширяющее действие эстрогенов обусловлено как их прямым действием на гладкие мышцы (ингибирование потенциалчувствительных кальциевых каналов, активности ангиотензинпревращающего фермента), сопровождающимся уменьшением сосудосуживающего действия катехоламинов, так и опосредованным эндотелием

эффектом (эстрогены стимулируют образование окиси азота, активируя синтазу окиси азота непосредственно или усиливая действие ацетилхолина через М-холинорецепторы эндотелиальных клеток). Эстрогены, обладая антиоксидантыми свойствами, могут также увеличивать время жизни окиси азота и тем самым повышать её сосудорасширяющее действие.

Кроме того, было установлено, что лечение эстрогенами сопровождается снижением частоты сердечных сокращений [10]. В экспериментах *in vitro* выявлено, что 17-β-эстрадиол уменьшает сокращения перфузируемого сердца кроликов и укорачивает продолжительность потенциала действия выделенных миоцитов желудочков сердца морских свинок, предотвращает развитие аритмии, вызываемое мембранной деполяризацией.

Особенно актуальны исследования взаимоотношений между стероидными гормонами и некоторыми лекарственными средствами с антиаритмической активностью, так как эти группы препаратов могут при ряде патологических состояний (например, при ишемической болезни сердца) быть использованы одновременно. Такие исследования имеют также важное практическое значение и для беременных женщин, поскольку значительный подъём уровня эстрогенов и гестагенов при беременности может заметно изменять свойства обезболивающих средств с антиаритмической активностью, нередко применяемых при родоразрешении.

Согласно имеющимся литературным данным среди женских половых стероидных гормонов наибольшей способностью влиять на кровоток в сердце и регулировать проводящую систему в нём обладает 17-β-эстрадиол [9, 11]. Во-первых, были обнаружены эстрогенные рецепторы в миоцитах сердца, а во-вторых, показана способность эстрогенной терапии снижать частоту сердечных сокращений и артериальное давление у человека и уменьшать сокращения изолированного сердца кролика. 17-β-Эстрадиол (3–10 мкМ) укорачивает продолжительность потенциала действия в миоцитах предсердия морских свинок, но заметно не влияет на величину потенциала покоя [11]. Вещество Е-4031(1 мкМ), относящееся к III классу антиаритмических средств (индуцирует потенциалы при их небольших величинах $-20 \div -40$ мВ), заметно увеличивало продолжительность потенциала действия и вызывало раннюю постдеполяризацию, а 17-β-эстрадиол (10 мкМ) подавлял его эффекты. Кроме того, 17-β-эстрадиол блокировал способность изопротеренола (индуцирует деполяризацию при относительно высоких мембранных потенциалах $-50 \div -60$ мВ) вызывать деполяризацию и нарушения ритма сердечных сокращений.

17-β-Эстрадиол концентрационно зависимым образом уменьшал ток ионов кальция через каналы L-типа, а проницаемость кальциевых каналов Т-типа он уменьшал на 10% только при большой концентрации (10 мкМ).

Следовательно, 17-β-эстрадиол ингибирует нарушение автоматизма сердечных сокращений, обусловленное именно током ионов кальция через каналы L-типа. Диэтилстильбэстрол и этинилэстрадиол действовали аналогично; их способность ингибировать кальциевые каналы L-типа уменьшалась в ряду: диэтилстильбэстрол > этинилэстрадиол > 17-β-эстрадиол. Между тем, тестостерон и прогестерон в этом отношении были не активны. 17-β-Эстрадиол и диэтилстильбестрол также ингибировали увеличиваемый цАМФ ток ионов кальция через каналы L-типа, но цГМФ или L-NAME не блокировали влияние эстрогенов на кальциевый ток. Эти результаты позволяют считать, что специфические антиаритмические эффекты эстрогенов обусловлены их действием на кальциевые каналы L-типа и что указанный тип фармакологической активности эстрогенов может иметь важное значение в реализации их кардиопротективного действия.

Важным практическим аспектом отмеченного типа кардиотропного эффекта женских половых стероидных гормонов является потенцирование 17-β-эстрадиолом кар-

диодепрессивного действия местных анестетиков лидокаина и бупивакаина [12]. Известно, что при беременности происходит увеличение чувствительности миокарда к подавлению частоты сердечных сокращений, вызываемому бупивакаином. Выявлено, что 17-β-эстрадиол (3,3 нМ) значительно увеличивает способность бупивакаина (10,4 мкМ) или лидокаина (85,4 и 129 мкМ) подавлять максимальную скорость повышения потенциала действия (V_{max}) отрезков сердца, содержащих волокна Пуркинье и мышцы клеток желудочков овариэктомированных крольчих. Сам по себе 17-β-эстрадиол не влиял на V_{max} и не потенцировал способность блокатора натриевых каналов тетродотоксина (3 мкМ) подавлять V_{max}. Добавление 17-β-эстрадиола к препаратам миокарда, предварительно проинкубированным с бупивакаином в течение 30 мин, приводило к дальнейшему снижение V_{max} в течение 10 мин. В присутствии 17-β-эстрадиола наблюдалось повышение способности бупивакаина сильнее подавлять V_{max} при более высоких частотах (3 Гц). В то же время замедление бупивакином проводимости уменьшалось или даже обращалось в присутствии 17-β-эстрадиола. Такие быстрые эффекты эстрадиола не могут быть обусловлены его действием на геном, которое развивается в течение нескольких часов. Поскольку эстрадиол потенцировал ингибирование возбудимости миокарда, но увеличивал замедление проведения импульсов от волокон Пуркинье к мышце желудочка, вызываемое местными анестетиками, следует считать, что гормон должен изменять проницаемость мембран более чем для одного типа ионов. Поэтому следует принимать во внимание, что беременность или другие состояния, приводящие к изменению уровня стероидных гормонов, могут влиять на кардиотоксичность местных анестетиков и антиаритмических средств.

Другой тип женских половых стероидных гормонов — гестагены также способны влиять на электрофизиологические эффекты местных анестетиков в сердце. Предварительное введение овариэктомированным крольчихам прогестерона (30 мг/кг/день) в течение 4 дней приводит к увеличению способности бупивакаина (3,5–18,7 мкМ), но не ропивакаина или лидокаина подавлять V_{max} выделенного препарата волокон Пуркинье — мышечных волокон желудочка сердца [13]. Следует отметить, что ропивакаин по сравнению с бупивакаином является менее выраженным кардиодепрессантом. Следовательно, повышение прогестероном кардиодепрессивного эффекта бупивакаина может также и в случае с эстрадиолом иметь важное значение в увеличении токсичности этого анестетика при беременности. Вместе с тем следует отметить, что кардиотропные эффекты гестагенов выражены в меньшей степени, чем эстрогенов, и их механизмы менее понятны [14].

В отношении 17-β-эстрадиола есть все основания утверждать, что он проявляет свойства антиаритмического средства. Ингибируя развитие ранней постдеполяризации и возникновение триггерных потенциалов, он может предотвращать появление полиморфной тахикардии желудочков, вызываемой антиаритмическими веществами или у пациентов с синдромом продолжительного интервала QT. Менопауза является закономерным физиологическим состоянием, однако гормональные сдвиги, которые происходят в этот период, особенно резкое снижение уровня эстрогенов, вносят существенный вклад в изменение качества жизни и патогенез многих «возрастных» заболеваний у женщин. Патогенетическим методом коррекции климактерических расстройств и профилактики метаболических нарушений (костный метаболизм, обмен липидов) является заместительная терапия эстроген-гестагенными препаратами (ЗГТ). Преимуществом этого метода является возможность с помощью одного лекарства воздействовать на многие органы и системы, что во многих случаях позволяет избежать полипрагмазии и снизить стоимость лечения по сравнению с использованием симптоматический терапии. В настоящее время показания к терапии эстрогенами чётко определены; к ним относятся купирование климактерических рас-

стройств и симптомов урогенитальной атрофии, преждевременная менопауза, а также профилактика остеопороза. Благоприятное влияние на костную ткань является дополнительным преимуществом при назначении ЗГТ по поводу менопаузальных симптомов. У женщин без менопаузальных расстройств при наличии высокого риска остеопороза и переломов ЗГТ может быть первой фазой длительной программы лечения (в последующем — бисфосфонаты, СЭРМ и др.). Следует подчеркнуть, что для достижения остеопротективного эффекта продолжительность эстрогенной терапии должна составлять не менее 1 года, тогда как купирование климактерических жалоб наблюдается уже в течение первых месяцев терапии.

В рандомизированном клиническом исследовании «Инициатива во имя здоровья женщин» (WHI) было выявлено, что частота переломов на фоне эстроген-гестагенной терапии снижается на 24%. По поводу влияния эстрогенов на частоту заболеваний ССС в последние годы высказываются противоречивые мнения. Показано, что эстрогены неэффективны для вторичной профилактики при уже развившемся атеросклерозе, но уменьшают риск заболеваний инсультов и инфарктов в том случае, если назначаются у женщин в период пре- и ранней постменопаузы. Об этом убедительно свидетельствуют данные наблюдательных эпидемиологических исследований, в том числе Nurses Health Study («Изучение здоровья медсестёр»), представленные на конгрессе Североамериканского общества по менопаузе в 2004 г. У женщин, начавших ЗГТ не позднее, чем через 4 года после менопаузы, относительный риск ССЗ составил 0,54–0,92 в зависимости от типа применявшихся препаратов. Следует подчеркнуть, что в исследовании WHI также отмечено снижение частоты сердечно-сосудистых заболеваний у женщин, начавших приём препаратов не позднее, чем через 10 лет после менопаузы (относительный риск 0,56–0,89). И только у очень пожилых женщин, начавших терапию через 20 и более лет после последней менструации, риск ССЗ возрастал.

Эффекты эстрогенов зависят от степени развития атеросклероза в момент начала ЗГТ. На начальных стадиях атеросклероза механизмы ангиопротекторного действия эстрогенов включают увеличение образования NO, повышение активности циклооксигеназы-2, снижение уровня фактора некроза опухолей альфа, молекул, вызывающих адгезию, окисления липидов, активации тромбоцитов и пролиферации гладкомышечных клеток. В то же время плейотропные эффекты эстрогенов в позднюю стадию развития атеросклероза изменяются (рис. 9.3, цветная вклейка).

В период пременопаузы интенсивность начальных процессов развития атеросклероза определяет прогрессирование атеросклероза в постменопаузе и риск развития заболеваний ССС в будущем. Несмотря на то что развитие атеросклероза зависит от уровня соотношения липиды/липопротеины в плазме, основным модулятором является дефицит эстрогенов. Как в эксперименте у обезьян, так и у женщин в пременопаузальном периоде восполнение эстрогенного дефицита с помощью эстрогенсодержащих контрацептивов предотвращает развитие атеросклероза.

В перименопаузальный/ранний постменопаузальный период эстрогенный дефицит становится сильно выраженным. У обезьян заместительная терапия эстрогенами, начатая сразу после хирургической менопаузы, уменьшает на 70% прогрессирование коронарного атеросклероза. Аналогичным образом эстрогены действовали и у женщин. Согласно данным мета-анализа ЗГТ у женщин моложе 60 лет уменьшает общую смертность (относительный риск 0,61, 95% CI: 0,39–0,95). Согласно данным большого наблюдательного исследования с участием 121 700 женщин в возрасте от 30 до 55 лет, ЗГТ, начинаемая в возрасте, близком к менопаузе, уменьшает риск развития коронарных заболеваний примерно на 50%. У женщин с уровнем эстрадиола 80 пг/мл ангиографический контроль показал отсутствие заболеваний ССС, но они были выявлены при снижении концентрации эстрадиола ниже 40 пг/мл.

В постменопаузальном периоде кардиопротективные эффекты эстрогенов исчезают. Начало приёма эстрогенов через 10 и более лет после наступления менопаузы приводит к увеличению частоты сердечно-сосудистой патологии, что может быть связано с повышением воспалительных процессов в атеросклеротических бляшках и нестабильности бляшки. В этот период полезным оказывается применение статинов.

9.4. Лекарственные средства для заместительной гормональной терапии

Заместительная гормональная терапия может облегчить трудности переходного периода у большинства женщин. Для её проведения используются различные классы эстрогенов. В первую группу входят нативные эстрогены — эстрадиол, эстрон и эстриол. Вторая группа включает конъюгированные эстрогены, преимущественно сульфаты, — эстрон, эквилин и 17-β-дигидроэквилин, которые получают из мочи беременных кобылиц. Для целей ЗГТ могут быть использованы несколько препаратов, содержащих эстрогены, которые обеспечивают профилактику остеопороза (трансдермальный эстрадиол в дозе 50 мкг/день в течение года у постменопаузальных женщин увеличивает костную массу примерно на 2%, а в контроле происходит её снижение примерно на 1% в год), сердечно-сосудистых заболеваний (ЗГТ снижает риск развития заболеваний коронарных сосудов на 44%), болезни Альцгеймера (эстрогены уменьшает частоту возникновения старческого слабоумия на 50%).

Как известно, наиболее активным эстрогеном является этинилэстрадиол. Его дозы, которые необходимы для купирования климактерических симптомов, равны 5–10 мкг/день, перорально. Однако, вследствие узкого диапазона терапевтических доз, большой вероятности развития побочных эффектов и не такого благоприятного влияния на метаболические процессы как у природных эстрогенов этот гормон для целей ЗГТ использовать не целесообразно.

Эстриол и его производные в обычных дозировках не оказывают пролиферативного эффекта на эндометрий, но в достаточной степени не защищает костную ткань от остеопороза, что также сдерживает его использование для системного введения и в основном он применяется местно. В настоящее время при ЗГТ наиболее широко используются следующие типы эстрогенов:

1) препараты для перорального введения — эстрадиола валерат, эстрадиола бензоат, эстриола сукцинат, конъюгированные эстрогены, микронизированные формы эстрадиола;

2) препараты для трансдермального введения — эстрадиол;

3) препараты для внутримышечного введения — эстрадиола валерат;

4) препараты для интравагинального введения — эстриол.

Для перорального введения нельзя использовать кристаллическую форму 17-β-эстрадиола, так как в этом случае он практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте. Поэтому при таком пути введения используют эфиры эстрадиола, чаще всего в виде 17-валерата.

Эстрадиола валерат быстро метаболизируется до 17-β-эстрадиола, поэтому его можно рассматривать как препарат-предшественник естественного эстрогена. Эстрадиол не является метаболитом или конечным продуктом обмена эстрогенов, а представляет собой основной циркулирующий эстроген у женщин в пременопаузальном периоде. Поэтому эстрадиола валерат представляется идеальным эстрогеном для заместительной гормональной терапии, учитывая что её целью является восста-

новление гормонального равновесия до показателей, существовавших до угасания функции яичников.

Независимо от используемой формы эстрогена его дозировка должна быть достаточной как для купирования наиболее выраженных климактерических расстройств, так и профилактики хронической патологии. В частности, эффективная профилактика остеопороза предусматривает приём 2 мг эстрадиола валерата в сутки.

Эстрадиола валерат оказывает положительное влияние на липидный обмен, проявляющийся повышением уровня липопротеинов высокой плотности и снижением уровня липопротеинов низкой плотности. Наряду с этим, препарат не оказывает выраженного действия на синтез белков в печени.

В состав конъюгированных эквинэстрогенов, получаемых из мочи жерёбых кобыл, входит смесь сульфатов натрия, эстронсульфат (они составляют около 50%). Большинство других компонентов гормонов или их метаболитов являются специфичными для лошадей: эквилинсульфат — 25% и 17-α-дигидроэквилинсульфат — 15%. Оставшиеся 15% составляют неактивные сульфаты эстрогенов. Эквилин обладает высокой активностью; он депонируется в жировой ткани и продолжает действовать даже после прекращения введения препарата.

Эстрогены конской мочи и их синтезированные аналоги оказывают более резкое влияние на синтез субстрата ренина и гормоносвязывающие глобулины по сравнению с эстрадиола валератом.

Не менее значимым фактором является биологический полупериод лекарственного препарата. Эстрогены конской мочи не включаются в метаболизм в печени и других органах, тогда как эстрадиол быстро метаболизируется с полупериодом существования 90 мин. Этим объясняется очень медленное выведение эквилина из организма, о котором свидетельствует сохранение его повышенного уровня в сыворотке крови, отмеченное даже через три месяца после прекращения терапии.

Другие природные эстрогены — эстрон и эстриол имеют меньшую биологическую активность. В обычной оральной дозе 2–4 мг эстриол не оказывает стимулирующего действия на эндометрий и для профилактики остеопороза, благоприятного действия на липидный метаболизм и сердечно-сосудистую систему назначение одного эстриола в обычно используемой дозе недостаточно.

Таким образом, существующие данные о фармакологических свойствах различных эстрогенов указывают на предпочтительность использования для целей ЗГТ препаратов, содержащих эстрадиол. Среди пероральных препаратов для ЗГТ врачи (особенно в Европе) чаще всего назначают средства, содержащие эстрадиола валерат — пролекарство эндогенного 17-β-эстрадиола. В дозе 1–2 мг эстрадиола валерат для перорального приёма как монотерапия или в комбинации с гестагенами показал высокую эффективность в терапии климактерических расстройств (препараты Климен, Климонорм, Циклопрогинова, Прогинова).

Для парентерального введения существуют препараты эстрадиола для подкожного введения (классическая форма-депо — препарат Гинодиан-депо, который вводится 1 раз в месяц).

Наиболее физиологичным путём создания нужной концентрации эстрогенов в крови женщин следует признать трансдермальный путь введения эстрадиола, для чего были разработаны препараты накожных пластырей эстрадиола, среди которых одним из лучших является пластырь Климара, применяемый раз в неделю и обеспечивающий постоянный уровень эстрадиола в крови. Фармакокинетика эстрадиола при его трансдермальном введении отличается от той, которая имеет место после его перорального введения. Это отличие заключается в первую очередь исключением обширного начального метаболизма эстрадиола в печени и значительно меньшим влиянием на печень. При трансдермальном введении эстрадиол меньше превращается

в эстрон, который после перорального приёма препаратов эстрадиола превосходит по своему уровню последний в плазме крови. Кроме того, после перорального приёма эстрогенов они в значительной степени подвергаются печёночно-кишечной рециркуляции. В результате при использовании пластыря Климара имеет место близкое к норме соотношение эстрон/эстрадиол в крови и исчезает эффект первичного прохождения эстрадиола через печень, но сохраняются благоприятное влияние гормона на вазмоторные симптомы и защита костной ткани от остеопороза. Оральный, но не трансдермальный эстрадиол увеличивает уровень секс-стероидсвязывающего глобулина в сыворотке и содержание холестерина в желчи. Трансдеремальный эстрадиол, по сравнению с оральным, примерно в 2 раза слабее влияет на обмен липидов в печени.

Для 2/3 всех женщин оптимальными дозой эстрогенов является 2 мг эстрадиола (перорально) или 50 мкг эстрадиола (трансдермально). Однако в каждом случае в процессе проведения ЗГТ женщинам следует проходить обследования в клинике для коррекции этих доз. У женщин после 65 лет происходит снижение почечного и особенно печёночного клиренса гормонов, что требует особой осторожности в назначение эстрогенов в высоких дозах. Имеются данные, что для профилактики остеопороза могут быть достаточными более низкие дозы эстрадиола (25 мкг/день).

ЗГТ должна соответствовать возрасту, должна быть постоянной и индивидуальной. При подборе дозы необходимо учитывать как возраст и вес пациенток, так и особенности анамнеза, а также относительный риск и противопоказания к использованию.

Большое внимание учёные уделяют влиянию эстрогенов и гестагенов на систему гемостаза. При сравнении конъюгированных эстрогенов (перорально 0,625 мг/сут, непрерывный режим) и 17-β-эстрадиола (трандермально, 50 мкг/сут) у женщин в климактерии при ежемесячном приёме в течение 14 дней медропксипрогестерона ацетата (перорально 5 мг/сут) обнаружено, что конъюгированные эстрогены в отличие от эстрадиола вызывают статистически значимое снижение антитромбина-III в плазме через 3, 6, 9 и 12 месяцев после начала терапии. При этом оба типа эстрогенов не влияли на протромбиновое время, фактор V, фибриноген, количество тромбоцитов и время лизиса эуглобулина. За 12 месяцев среди участниц исследования не возникло ни одного тромбоэмболического осложнения. Согласно этим результатам, конъюгированные эстрогены снижают уровень атитромбина-III, в то время как ЗГТ 17-β-эстрадиолом не влияет на этот показатель. Уровень анитромбина-III имеет ключевое значение в развитии инфаркта миокарда и тромбоэмболий. Дефицит антиромбина-III бывает врождённым и приобретённым. Отсутствие способности конъюгированных эстрогенов оказывать протективное действие у женщин с инфарктом миокарда может быть связано именно с их влиянием на содержание антитромбина-III в крови. Поэтому натуральные эстрогены предпочтительнее, чем пероральная терапия конъюгированными эстрогенами при назначении ЗГТ пациенткам с факторами риска развития тромбоза.

В этой связи следует отметить, что исторически сложившееся до последних лет более широкое использование препаратов конъюгированных эстрогенов в США нельзя считать наилучшим и рекомендовать во всех случаях. Об этих очевидных фактах можно было бы и не говорить, если бы в литературе не появлялись высказывания в пользу применения препаратов конъюгированных эстрогенов [1], основанные только на широком их использовании в США и существовании достаточно большого количества исследований их свойств. Кроме того, никак нельзя согласиться с высказываниями о наилучших свойствах медроксипрогестерона ацетата среди гестагенов, входящих с состав различных комбинаций для ЗГТ, в отношении их влияния на обмен липидов.

Несмотря на многие положительные свойства эстрогенов, важное значение имеют другие их возможные эффекты, которые в ряде случаев могут быть нежелательными. Поэтому специального рассмотрения требуют показания и противопоказания использования эстрогенов у женщин с климактерическими расстройствами. Гиперлипидемия, гипертензия и диабет в настоящее время рассматриваются как показания для проведения ЗГТ. Существуют много данных, свидетельствующих о том, что ЗГТ не связано с развитием таких онкологических заболеваний, как рак прямой кишки, лёгких, печени, яичников, шейки матки, меланомы и лейкемии. Тем не менее, этого нельзя сказать в отношении миометрия и эндометрия. Риск развития гиперпластических изменений в матке при использовании монотерапии эстрогенами может увеличиваться. Однако при комбинации эстрогенов с гестагенами такого увеличения не происходит и рак эндометрия при проведении ЗГТ не является клинической проблемой. Гестагены уменьшают уровень эстрогеновых рецепторов в эндометрии и увеличивают местный метаболизм эстрадиола вследствие индукции 17-β-гидроксистероиддегидрогеназы, которая катализирует превращение эстрадиола в эстрон, а также способствуют трансформации эндометрия из пролиферативной в секреторную фазу. Единственным не совсем ясным вопросом в отношении взаимосвязи между развитием рака и проведением ЗГТ является рак молочной железы. Последние эпидемиологические исследования позволяют считать, что заместительная терапия эстрогенами продолжительностью менее 10 лет не вызывает риска развития рака молочной железы, но данный риск может увеличиваться, если ЗГТ длится больше этого срока. Риск развития рака груди у женщин с возрастом увеличивается на 7%, а при проведении ЗГТ эстрогенами или комбинацией эстрогенами/гестагенами более 10 лет он увеличивается до 9%. Имеются данные нескольких исследований проведения ЗГТ эстрогенами у женщин, оперированных по поводу рака молочной железы, согласно которым она не приводит к возникновению рецидивов онкологического заболевания. Поэтому для всех женщин с интактной маткой при проведении ЗГТ необходимо сочетать эстрогены с гестагенами, которые защищают эндометрий от указанного эффекта эстрогенов. Проведение монотерапии эстрогенами в постменопаузальном периоде связывают с повышением риска рака эндометрия. Их применение в комбинации с прогестагеном устраняет подобный риск.

В качестве гестагенов наряду с прогестероном применяются как его производные — 20-α- и 20-β-дигидростерон, 17-α-гидроксипрогестерон, так и производные 19-нортестостерона.

Производными гидроксипрогестерона (C_{21}-гестагены) являются хлормадинона ацетат, ципротерона ацетат, медроксипрогестерона ацетат, гидрогестерон и другие, а производными 19-нортестостерона — норэтистерона ацетат, норгестрел, левоноргестрел, норгестимат и другие.

При циклическом режиме проведения ЗГТ гестагены, как правило, нужно использовать не менее 10 дней. Комбинированная эстроген/гестагенная терапия в постоянном режиме более предпочтительна для женщин в период постменопаузы и не рекомендуется в пременопаузе вследствие высокого риска возникновения кровотечений. Согласно клиническим наблюдениям добавление гестагена не только защищает эндометрий от гиперпластического действия эстрогенов, но в некоторых случаях может благоприятно повлиять на ранее развившуюся простую гиперплазию.

Доза и подбор гестагена должны осуществляться таким образом, чтобы, с одной стороны, препятствовать пролиферации эндометрия, а с другой стороны — получить как можно меньше нежелательных гестагензависимых побочных эффектов. И, кроме того, нужно правильно использовать так называемые частичные (дополнительные) эффекты, которые характерны для некоторых гестагенов. В частности, ципротерону ацетату присущ выраженный антиадрогенный эффект. Поэтому его присутствие

в препарате Климен позволяет лечить у женщин в период климактерия андрогензависимые патологические изменения в коже (акне, гирсутизм).

При выборе гестагенов также необходимо учитывать их неодинаковую способность влиять на индуцируемые эстрогенами благоприятные изменения обмена липидов. Если эстрадиол увеличивает содержание фракции триглицеридов и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), то производные 19-норстероидов вызывают противоположное действие. Однако, этот эффект зависит от дозы гестагена. Так, например, при приёме комбинированного препарата (Климонорм), содержащего левоноргестрел в дозе 0,150 мг/день, в течение 2 лет не возникает никакого существенного, статистически значимого влияния на липиды.

Существуют сообщения о том, что некоторые виды гестагенов, особенно с более выраженными андрогенными свойствами, такие как производные 19-нортестостерона, оказывают отрицательное действие на липидные фракции плазмы крови. Норэтистерон противодействует положительному влиянию эстрогенов на концентрацию ЛПВП-холестерина и, кроме того, может повышать уровень липопротеинов низкой плотности, увеличивая тем самым риск сердечно-сосудистой патологии.

Поэтому для достижения благоприятного влияния ЗГТ на липидный обмен лучше использовать такой гестаген, как ципротерона ацетат (входит в состав препарата Климен), не влияющий на активность эстрогенов в отношении сывороточных липопротеинов. Приём Климена приводит к увеличению содержания ЛПВП ($p < 0{,}05$) в сыворотке и не оказывает влияния на другие липопротеины.

Климен разработан с целью повышения эффективности заместительной гормональной терапии и профилактического применения с учётом требований максимальной безопасности препарата. Этот препарат, отличаясь оптимальным соотношением гормонов, не только оказывает положительное влияние на липидный профиль, но и способствует быстрому уменьшению климактерических симптомов и профилактике остеопороза, эффективен при расстройствах мочеполовой системы и кожных атрофических нарушениях.

Важнейшей особенностью Климена является то, что он содержит прогестаген с уникальными антиандрогенными свойствами. Прогестаген ципротерона ацетат — новый компонент заместительной гормональной терапии, хотя он уже несколько лет используется в лечении ряда заболеваний предстательной железы и при гиперсексуальности у мужчин (препарат Андрокур). Также он занимает важное место среди средств пероральной контрацепции и при лечении акне и гирсутизма у женщин (препарат Диане-35). Таким образом, имеется обширный и длительный, более чем 20-летний, опыт применения ципротерона ацетата, включая применение в повышенных дозах.

Ципротерона ацетат — единственный прогестаген с выраженным сочетанием прогестагенных и антиандрогенных свойств, используемый при климактерических расстройствах. Из всех вариантов заместительной терапии комбинация эстрадиола валерата и ципротерона ацетата оказывает наиболее положительное влияние на липидный профиль.

Реакция эндометрия на Климен анализировалась у 28 пациенток по данным 50 биопсий, проведённых во время 3, 4, 5 и 6 циклов. У 16 пациенток в цикле 12 была проведена дополнительная биопсия. В всех случаях биопсия, выполнявшаяся в конце цикла, показала положительную секреторную динамику, обусловленную прогестагенным влиянием ципротерона ацетата на эндометрий, «инициированный эстрогеном».

В итоге, ципроатерона ацетат как компонент Климена имеет выраженный прогестагенный эффект в дозе 1 мг. Следовательно, Климен способствует снижению риска гиперплазии эндометрия и развития карциномы, в отличие от монотерапии.

Увеличение веса вызывает особое беспокойство у многих женщин. На фоне приёма Климена масса тела остаётся стабильной более чем у 70% женщин. Её увеличение на 2 кг и более отмечено только у 20% группы численностью 585 человек.

При определении ряда лабораторных показателей до лечения Клименом и после него (глюкоза, инсулин, триглицериды, липопротеины высокой плотности, липопротеины низкой плотности, общий холестерин, антитромбин-III, щелочная фосфатаза, билирубин, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, глобулин, связывающий половые гормоны) изменений большинства из них не отмечено. Исключениями были повышение уровня глобулина, связывающего половые гормоны, и ранее упомянутые положительные изменения уровня липидов. Поскольку эти изменения обусловлены эстрогеном, ципротерон не оказывает значимого влияния на обменные процессы в печени.

Эстрадиола валерат, как компонент Климена, способствует нормализации состояния кожи в постменопаузальном периоде — повышает содержание влаги в коже, увеличивает толщину эпидермиса, нормализуя содержание коллагена в коже и её толщину. Установлено, что у женщин, проходивших курс заместительной гормональной терапии, содержание коллагена в коже существенно выше по сравнению с женщинами такого же возраста, не подвергавшихся терапии. Наряду с этим, отмечено увеличение толщины эпидермиса у женщин, которым эстрадиола валерат назначался после овариэктомии.

Данные о переносимости Климена получены в группе из 585 пациенток, в которой общее количество курсов приёма составило 1172. Частота жалоб на напряжение в молочных железах и других осложнений снизилась на фоне продолжающегося приёма препарата до величин ниже исходных.

Таким образом, комбинация эстрадиола валерата и ципротерона ацетата в Климене обеспечивает:

1) уменьшение климактерических симптомов;

2) профилактику постменопаузального остеопороза;

3) положительное влияние эстрогена на атерогенный индекс, которое не блокируется прогестагеном;

4) положительное действие при кожных изменениях, обусловленных андрогенами за счёт антиандрогенных свойств гестагена ;

5) отсутствие явлений гиперплазии эндометрия на фоне приёма Климена.

Если Климен наиболее благоприятен в отношении профилактики и лечения атеросклеротических нарушений и андрогензависимых заболеваний кожи у женщин в период постменопаузы, то для ингибирования гиперпластических процессов в эндометрии можно использовать производные 19-норстероидов с более высокой гестагенной активностью — норгестрел (препарат Циклопрогинова), левоноргестрел (препарат Климонорм), норэтистерона ацетат (препарат Примолют Нор) и др.

Существующие данные показывают, что в используемых дозах в препарате Климонорм C_{19}-производное левоноргестрел в низкой дозе (150 мкг/сут) не влияет на положительное действие эстрадиола на обмен липидов. Другой гестаген, ципротерона ацетат, обладающий антиадрогенными свойствами, даже усиливает положительные сдвиги в липидном спектре крови, индуцируемые эстрогенами (препарат Климен).

До последних лет при рассмотрении целесообразности назначения препаратов женских половых стероидных гормонов в основном принимали во внимание уровень эстрогенов и гестагенов в крови, хотя реализация биологической активности стероидов зависит от функциональной активности их рецепторных систем, которая, как оказалось, подвержена инидивидуальным особенностям. Во-первых, в процессе жизни могут возникать мутации генов рецепторов, а во-вторых, существует генетически обусловленный полиморфизм эстрогенных рецепторов. Согласно данным [27],

которые оценивали вариабельность генотипа (PP, Pp и pp) эстрогенных рецепторов у 900 женщин в возрасте от 55 до 80 лет, менопауза при генотипе pp наступает на 1,1 года позже, чем при генотипе PP. При этом у женщин с генотипиом PP риск хирургической менопаузы был в 2,4 раза раза выше, по сравнению с женщинами с генотипом pp. Следовательно, от вариабельности генов эстрогенных рецепторов зависит как время наступления природной, так и хирургической, обусловленной гистерэктомией при фиброидах или меннорагиях, менопаузы. При этом интересно отметить, что полиморфизм генов эстрогенных рецепторов влияет и на развитие ряда соматических заболеваний, сцепленных с полом. В частности, генотип PpXx с комбинацией Pvu II и Xba I даёт повышение риска возникновения остеоартрита в 1,86 раза [26]. В будущем исследования должны дать ответ, как характер генотипа определяет склонность к развитию у женщин эстрогензависгых заболеваний органов мочеполовой сферы и опорно-двигательного аппарата.

Доказана обоснованность этой терапии для профилактики и лечения болезни Альцгеймера и остеопороза. Несмотря на существование многочисленных данных о кардиопротективных свойствах эстрогенов и их способности снижать смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, продолжает дискутироваться вопрос о целесообразности применения эстрогенов для вторичной профилактики инфаркта миокарда и о характере действия прогестагенов на сердечно-сосудистую систему. Важным вопросом остаётся взаимосвязь гормональной терапии с риском развития рака молочных желёз (хотя он невелик, имеются работы, свидетельствующие о его существовании). Поскольку прогестагены модифицируют пролиферативный эффект эстрогенов в молочной железе, требуются дальнейшие исследования сочетанного применения различных прогестинов с эстрадиолом в плане снижения риска возникновения гормонозависимых опухолевых заболеваний молочных желез.

В будущем в дополнение к классической заместительной гормональной терапии с помощью эстрогенов и гестагенов перспективным окажется возможное использование селективных модуляторов эстрогенных рецепторов, таких как ралоксифен, которые сочетают в себе эстрогенные и антиэстрогенные свойства. В отличие от эстрогенов, ралоксифен не стимулирует ткани молочной железы и матки, но предотвращает остеопороз и снижает уровень холестерина в сыворотке.

Таким образом, ЗГТ у женщин у период угасания функции яичников продолжает совершенствоваться, и по мере получения новых данных как о функционировании рецепторного аппарата эстрогенов и гестагенов и их взаимоотношениях, так и появления новых препаратов, терапевты и гинекологи смогут более обоснованно проводить фармакотерапию у женщин, испытывающих недостаток женских половых стероидных гормонов.

С нашей точки зрения, важно различать характер кардиотропных эффектов эстрогенов при их длительном и однократном введении. Если после однократного введения эстрадиола имеет место блокирование кальциевых каналов L-типа в клетках с частичной деполяризацией и развивается отрицательный хронотропный эффект, то при хроническом введении эстрогенов могут иметь место изменения транскрипции различных мембранных белков, в частности тех, которые формируют калиевый канал [15].

Эстрадиол влияет на свёртывающую систему крови — уменьшает уровень фибриногена (прокоагулянт), антитромбина-III и протеина-S (антикоагулянтные факторы). В целом, значимых сдвигов не происходит. Синтетические эстрогены более агрессивны: возможны повышение свёртываемости крови (с риском тромбообразования!) из-за стимуляции синтеза факторов свёртывания II, VII, IX, X, плазминогена и уменьшения количества антитромбина III в крови; уменьшение ХсЛПНП и увеличение

количества ХсЛПВП и триглицеридов в крови; прямая вазодилатация; суммарно — антиатерогенное действие.

В присутствии эстрогенов наблюдается ускорение перехода жидкости из сосудов в межклеточное пространство, уменьшение объёма плазмы с компенсаторной задержкой в организме натрия и воды (в больших дозах эстрогены могут вызывать отёки и поэтому должны с осторожностью назначаться при болезнях сердца, почек, при эпилепсии, мигрени).

Прогестерон не влияет на систему гемостаза независимо от дозы, пути введения и режима применения. Синтетические гестагены слабо или совсем не влияют на систему коагуляции и фибринолиз, что позволяет применять чисто гестагенные контрацептивы даже у женщин с высоким риском тромбоза. Прогестерон оказывает модулирующее действие на агрегацию тромбоцитов, проявляя атерогенные свойства, а постоянный приём левоноргестрела способствует активации тромбоцитов без усиления коагуляции.

Действие прогестагенов на углеводный обмен и на липидный состав крови обусловлено их андрогенной активностью и дозой (см. побочные эффекты).

Характер влияния гестагенов на обмен липидов зависит от наличия у них андрогенных свойств, и в сочетании с эстрогенами они могут или не влиять или уменьшать липолитическое действие эстрогенов (табл. 9.3).

Исследования последних лет показали, что именно гестаген определяет конечные метаболические эффекты препарата. Известно, что гестагены с андрогенными свойствами (особенно в больших дозах) могут негативно влиять на липидный и углеводный обмен и, в ряде случаев, на функцию эндотелия, вследствие чего уменьшается благоприятное влияние эстрадиола. Поэтому в настоящее время преимущество отдаётся так называемым гестагенам, которые не противодействуют эффектам эстрадиола. Это особенно важно для монофазных эстроген-гестагенных препаратов, применяемых в период постменопаузы, поскольку продолжительность приёма и доза гестагена в таких случаях выше, чем при циклическом режиме. В последнее время всё большую популярность завоёвывает дроспиренон, входящий в состав препарата Анжелик, благодаря способности снижать артериальное давление, массу тела и улучшать настроение. Наиболее применяемые комбинированные гормональные препараты для ЗГТ представлены в табл. 9.4.

Повышение приемлемости терапии является важнейшим условием её максимальной эффективности. Снижение дозы эстрогена (точнее, подбор так называемой минимальной эффективной дозы) и совершенствование прогестагенного компонента ЗГТ позволяет улучшить переносимость и повысить безопасность терапии, что в конечном итоге ведёт к повышению приверженности пациенток лечению («комплайентности» терапии).

В связи с этим большой интерес представляет новый низкодозированный препарат для терапии климактерических расстройств — Анжелик, каждая таблетка которого содержит 1 мг эстрадиола (в форме гемигидрата) и 2 мг дроспиренона. Показано, что в постменопаузе низкая доза эстрогена (1 мг 17-β-эстрадиола) вполне достаточна и обеспечивает все необходимые эффекты: купирует вазомоторные симптомы, благоприятно влияет на липидный профиль, препятствует потере костной массы и при этом хорошо переносится. Известно, что использование эстрадиола в стандартной терапевтической дозе — 2 мг/сут — может вызывать задержку жидкости и связанные с ней побочные эффекты. По литературным данным 54–62 % женщин, сменивших или отменивших терапию, в числе основных причин назвали увеличение веса, нагрубание молочных желёз и отёки — симптомы, обусловленные задержкой жидкости. Задержка жидкости объясняется тем, что принимаемые орально эстрогены стимулируют выработку в печени ангиотензиногена, что приводит к активации

Таблица 9.3

Влияние гестагенов на обмен липидов при их совместном применении с эстрадиолом (2 мг) в течение 3 циклов у женщин в постменопаузе (по C. Lauritzen, 2000)

Гестаген (доза, мг)	Холестерин ЛПВП	Холестерин ЛПВП 2	Холестерин ЛПВП 3	Холестерин ЛПНП	Аполипопротеин A_1	Аполиопротеин A_2	Липопротеин (а)	Триацилглицериды
Прогестерон (200)	0	0	0	0	(↑)	0	(↓)	(↑)
Дидрогестерон (10)	0	0	0	0	(↑)	0	(↓)	(↑)
Хлормадинона ацетат (2)	→↓	↑	↓	→↓	→			→
Ципротерона ацетат (1)	↓	→	↓	↑	↓	↑	↓	↑
Медроксипрогестерона ацетат (10)	↓	↓↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑↑
Норэтистерон (1)	↓↓	↓↓↓	↓↓	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓	↓
Левоноргестрел (>0,15)	↓↓	↓↓	↓	↑	↓↓	↑	↓	↑
Гестоден (0,075)	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑
Дезогестрел (2)	↓	↓	↓	→	↓	↑	↓	→
Норгестимат (0,25)	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑
Диеногест (2)	→	→	→	→	↓	↑	↓	→

0 — Нет влияния; → — нет достоверного изменения; ↑ — небольшое увеличение; ↑↑ — сильное увеличение; ↓ — слабое уменьшение; ↓↓ — сильное уменьшение; ↓↓↓ — очень сильное уменьшение. ЛПВП — липопротеины высокой плотности; ЛПНП — липопротеины низкой плотности.

Таблица 9.4

Гормональные препараты для терапии климактерических расстройств и профилактики остеопороза

Торговое название препарата в России	Международное непатентованное название	Фармакологическая группа по системе АТХ*	Общая характеристика
Препараты для применения в пре- и перименопаузе			
Климонорм	Левоноргестрел и эстрадиола валерат	Прогестаген и эстроген	Современный двухфазный препарат. Содержит низкие дозы гормонов
Климен	Ципротерона ацетат и эстрадиола валерат	Гестаген с антиандрогенной активностью и эстроген	Современный двухфазный препарат с антиандрогенным эффектом

Таблица 9.4 (*окончание*)

Торговое название препарата в России	Международное непатентованное название	Фармакологическая группа по системе АТХ*	Общая характеристика
Препараты для применения в пре- и перименопаузе			
Цикло-Прогинова	Норгестрел и эстрадиола валерат	Прогестаген и эстроген	Традиционный двухфазный препарат. Гестаген имеет слабую андрогенную активность
Трисеквенс	Норэтистерон и эстрадиол	Прогестаген и эстроген	Традиционные трёхфазные препараты. Гестаген имеет слабую андрогенную активность
Дивина	Медроксипрогестеронацетат и эстрадиола валерат	Прогестаген и эстроген	Традиционный двухфазный препарат. Гестаген имеет слабую андрогенную активность
Фемостон	Дидрогестерон и эстрадиол	Прогестаген и эстроген	Современный двухфазный препарат. Гестаген метаболически нейтрален
Препараты для применения в постменопаузе			
Анжелик	Дроспиренон и эстрадиола гемигидрат	Прогестаген и эстроген	
Климодиен	Диеногест и эстрадиола валерат	Прогестаген и эстроген	Современный монофазный препарат. Диеногест — инновационный «гибридный» гестаген с антиандрогенным эффектом, метаболически нейтрален
Индивина	Медроксипрогестерон и эстрадиол	Прогестаген и эстроген	Традиционный монофазный препарат. Гестаген имеет слабую андрогенную активность
Фемостон 1/5	Дидрогестерон и эстрадиол	Прогестаген и эстроген	Современный монофазный препарат. Гестаген метаболически нейтрален
Клиогест	Норэтистерона ацетат + эстрадиола валерат	Эстроген-гестагенный препарат	Традиционный монофазный препарат. Гестаген имеет слабую андрогенную активность
Ливиал	Тиболон	Прогестаген с андрогенной активностью	Препарат с андрогенным, гестагенным и слабым эстрогенным эффектом

* АТХ — Международная анатомо-терапевтическо-химическая система классификации лекарственных средств («Anatomical Therapeutic Chemical classification Index with Defined Daily Doses», WHO Collaborating Centre for Drugs Statistics Methodology in Oslo, 2004). Разработана ВОЗ, принята Минздравом РФ («Государственный реестр лекарственных средств», МЗ РФ, Москва, 2004).

системы ренин–ангиотензин–альдостерон и увеличению реабсорбции натрия и воды в почечных канальцах. Естественный прогестерон способен блокировать рецепторы альдостерона в почечных канальцах, тем самым препятствуя задержке жидкости.

Однако в период менопаузы прогестерон вырабатывается в минимальных количествах, не достаточных для этого эффекта, и приём перорального эстрадиола часто приводит к задержке натрия и воды в организме. Снижение дозы эстрадиола до 1 мг/сут позволяет уменьшить это негативное влияние, не теряя при этом терапевтической эффективности в отношении симптомов менопаузы и профилактики остеопороза. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании [28] выявили выраженное снижение частоты приливов на фоне Анжелика у большинства женщин по сравнению с группой плацебо (90% против 45%, $p \leqslant 0{,}001$). В этой работе отмечены также статистически значимые отличия в отношении таких симптомов, как гипергидроз, бессонница, депрессия, нервозность и урогенитальные проявления.

Важнейшим преимуществом препарата Анжелик является хорошая переносимость и низкая частота побочных эффектов, что связано не только с низкой дозой эстрогена, но также и с уникальными свойствами прогестагенного компонента Анжелика, которым является дроспиренон. Дроспиренон является представителем нового класса синтетических прогестагенов — производных спиролактона, который помимо выраженного прогестагенного действия обладает также антиандрогенным и антиминералокортикоидным эффектом. По фармакологическому профилю дроспиренон близок к натуральному прогестерону, однако антиальдостероновый эффект дроспиренона более выражен и имеет клиническое значение. Дроспиренон не имеет эстрогенной, андрогенной, глюкокортикоидной активности, а антиандрогенные свойства обеспечивают ему положительные метаболические и клинические эффекты. Этот прогестаген метаболически нейтрален, не влияет на толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность, не противодействует благоприятному влиянию эстрогенов на липидный профиль крови. Способность блокировать рецепторы к альдостерону является уникальным свойством дроспиренона среди всех синтетических гестагенов (табл. 9.5). Благодаря этому дроспиренон препятствует задержке натрия и воды, вызываемой эстрогеном, и уменьшает частоту мастодинии, отёков и увеличения веса. Анжелик хорошо переносится пациентками; лишь в 2% случаев причиной отказа от терапии стала мастодиния и менее чем в 1% случаев — головная боль. Отсутствие задержки жидкости благоприятно сказывается на весе тела: приём Анжелика сопровождался потерей 1–1,5 кг, что всегда расценивается женщинами как положительный эффект.

Таблица 9.5

Фармакологический профиль синтетических прогестагенов

	Гестагенный	Эстрогенный	Андрогенный	Антиандрогенный	Глюкокортикоидный	Антиминералокортикоидный
Прогестерон	+	–	–	(+)	(+)	+
Дроспиренон	+	–	–	+	–	+
Дидрогестерон	+	–	–	–	–	(+)
Норэтистерон	+	(+)	+	–	–	–
Медроксипрогестерон	+	–	+	–	+	–
Тиболон	+	+	+	–	+	–

Уникальный фармакологический профиль дроспиренона — наличие антиандрогенного и антиальдостеронового эффектов — благоприятен для сердечно-сосудистой системы. Дроспиренон не препятствует благоприятному влиянию эстрадиола на липиды крови, и, кроме того, несколько уменьшает прирост триглицеридов, вызываемый эстрадиолом. Поэтому применение Анжелика сопровождается снижением ЛПНП при практически неизменном уровне триглицеридов. Защитное влияние Анжелика на сердце и сосуды связано также с антиальдостероновым эффектом дроспиренона. Как уже было сказано, эстрогены стимулируют систему ренин–ангиотензин–альдостерон, что может способствовать повышению артериального давления как вследствие увеличения объёма циркулирующей крови (ОЦК), так и в результате спазма сосудов, вызываемого ангиотензином. Известно также, что альдостерон вовлечён в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку стимулирует выработку в стенке сосудов коллагена и пролиферацию гладкомышечных клеток и тем самым способствует развитию структурных необратимых изменений в сосудах и создаёт морфологическую базу для «закрепления» транзиторной АГ. Аналогичные структурные изменения, происходящие в стенке сердца, способствуют повышению жёсткости миокарда и развитию его диастолической дисфункции. Это ограничивает использование эстрогенсодержащих препаратов у женщин с артериальной гипертензией. Благодаря антиальдостероновому эффекту дроспиренона Анжелик способствует нормализации артериального давления, а у женщин с мягкой систолической гипертензией — даже снижению АД на 5–10 мм рт. ст. Следует подчеркнуть, однако, что Анжелик не является препаратом для лечения артериальной гипертензии, у женщин с артериальной гипертензией он должен назначаться с осторожностью, в сочетании с традиционными гипотензивными препаратами (особенно на первом этапе терапии).

Принимая во внимание всё вышесказанное, можно заключить, что главными преимуществами Анжелика является низкая доза эстрадиола и прогестаген с антиминералокортикоидной активностью, с чем связаны хорошая переносимость, высокая приемлемость и дополнительные эффекты терапии. К ключевому эффекту Анжелика относится наличие дополнительных терапевтических преимуществ, а именно нормализация и стабилизация артериального давления.

Таким образом, Анжелик — низкодозированный препарат с уникальным прогестагеном — является оптимальным средством для ведения периода постменопаузы, обеспечивает высокое качество жизни и сохранение здоровья. По сути, препарат превосходит ожидаемые стандартные эффекты низкодозированной гормональной терапии, обеспечивает дополнительные терапевтические преимущества по сравнению с другими препаратами, применяющимися с традиционной целью «замещения гормонов».

При выборе типа фармакотерапии климактерического синдрома в каждом случае необходимо учитывать следующие факторы: путь введения, дозы, необходимость добавления гестагена, тип гестагена, режим ЗГТ.

Оральные препараты для ЗГТ лучше принимать женщинам с атрофическими изменения кожи, гиперхолестеринемией, возможно, курящим женщинам и женщинам с высоким риском развития рака толстой кишки.

Трансдермальные эстрогены предпочтительнее использовать у женщин с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, желчного пузыря, диабетом, гипертриглицеридемией и, возможно, у женщин после холецистэктомии.

Низкие дозы эстрогенов показаны женщинам с миомами матки и, возможно, женщинам в старческом возрасте. Высокие дозы эстрогенов могут быть использованы в том случае, если стандартные дозы не позволяет купировать климактерические симптомы. Низкие дозы гестагенов рекомендуются женщинам с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, а высокие дозы гестагенов — женщинам

с гипертриглицеридемией и высоким риском развития рака эндометрия, а также в случае наличия межменструальных кровотечений при использовании низких доз гестагенов.

Монотерапия эстрогенами показана женщинам с удалённой маткой и, возможно, женщинам в старческом возрасте, страдающим заболеванием сосудов сердца или болезнью Альцгеймера.

Комбинированная эстроген-гестагенная терапия показана женщинам с не удалённой маткой, а также женщинам с удалённой маткой при наличии гипертриглецеридемии или эндометриоза в анамнезе.

Гестагены с антиандрогенной активностью следует принимать женщинам с андрогензависимыми заболеваниями кожи, а также при увеличении резистентности к инсулину и при гиперхолестеринемии. Гестагены с андрогенной активностью полезны женщинам с нервно-психическими расстройствами или с остеопенией.

Выбор режима ЗГТ зависит от выраженности климактерического синдрома и его периода. В перименопаузе предпочтительно использовать гестагены в циклическом режиме или двухфазные комбинированные препараты. В ранней постменопаузе (13–60 месяцев после менопаузы) целесообразно применять двухфазные комбинированные препараты, а в более поздней менопаузе (61–120 месяцев после менопаузы) — постоянно использовать комбинацию эстрогена с гестагеном или двухфазные препараты в зависимости от индивидуальных особенностей женщины.

При наличии межменструальных кровотечений при использовании двухфазных препаратов необходимо внимательно следить за состоянием эндометрия. При возникновении кровотечений в случае использования постоянной монофазной комбинированной терапии рекомендуется либо увеличить дозу гестагена, либо применить циклический режим ЗГТ.

Таким образом, в настоящее время имеется достаточно большой выбор препаратов для ЗГТ, весьма хорошо изучены особенности её проведения в зависимости от возраста женщины и выраженности тех или иных климактерических симптомов, что позволяет надеяться на более широкое использование заместительной гормонотерапии, способной улучшить качество и увеличить продолжительность жизни у каждой женщины с учётом её индивидуальных особенностей.

В последние годы появляется всё больше фармакологических обоснований использования ЗГТ эстрогенами для профилактики и лечения ишемической болезни сердца у женщин при снижении выработки эндогенных женских половых гормонов. Однако полезность использования тех или иных эстрогенных препаратов для этих целей можно считать научно доказанным только в пери- и ранней постменопаузе.

Женские половые стероидные гормоны, в первую очередь эстрогены, обладают разнообразными воздействиями на сердечно-сосудистую систему. Они обусловлены главным образом прямым действием на рецепторы, локализованные в эндотелии сосудов и в гладкомышечных элементах, но может иметь значение также то, что эстрогены влияют на синтез факторов коагуляции и воспаления в печени, на чувствительность клеток к инсулину и на нейрональную регуляцию. Глубокое знание всех особенностей действия половых стероидных гормонов может помочь в поиске схемы их правильного применения при различных типах дефицитов того или иного типа гормона и обосновании назначения нужной дозы и пути введения.

9.4.1. Фармакологические свойства гестагенов. После открытия в 1929 г. прогестерона — ключевого гормона регуляции репродуктивной функции женских организмов — было синтезировано множество его аналогов и изучена их способность влиять на матку, яичник и молочные железы, а также на другие органы и системы. В процессе изучения механизмов действия гестагенов (прогестинов) были получены

данные о характере их влияния на созревание и выход яйцеклетки, имплантацию оплодотворённой яйцеклетки, поддержание и сохранение беременности, развитие лобулярно-альвеолярного аппарата молочной железы, на опосредование головным мозгом секреции гонадотропинов и полового поведения. На основании этих данных были разработаны и созданы различные гестагенные препараты, предназначенные не только для гормонозаместительной терапии при недостаточности эндогенного прогестерона, но и лечения нарушений менструального цикла, дисменореи, меноррагии, гормонозависимых опухолей, а также предупреждения нежелательной беременности. Углублённые исследования существующих гестагенов позволили получить сведения о широком спектре фармакологических свойств каждого препарата, выявить гетерогенность их рецепторов, опосредующих изменение функциональной активности не только органов репродуктивной системы, но и других тканей и органов, в частности кости, сердечно-сосудистой и иммунной систем. Анализ и обобщение этих данных необходимы для правильного и обоснованного выбора существующих гестагенных препаратов (в первую очередь, гормональных контрацептивов и средств для гормонозаместительной терапии при возрастной или хирургической менопаузе), лечения эндометриоза и гормонозависимых опухолей с учётом индивидуальных особенностей женщины.

9.4.2. Номенклатура и классификация гестагенов. В 1996 г. в Германии на первой европейской конференции гестагенного клуба была принята классификация и номенклатуры гестагенов, утверждены основные показания к их клиническому использованию, а также предложено их определение. Согласно этому определению к гестагенам (прогестинам) относятся вещества, которые, подобно прогестерону, способны трансформировать эндометрий, подвергнутый воздействию эстрогенов, в секреторное состояние (тест Клауберга). Все химические соединения, которые соответствуют этому определению, имеют стероидную структуру. Они сходны по своему действию на эндометрий, но отличаются между собой по действию на другие органы-мишени и различные метаболические процессы.

Все гестагены на основании их химической структуры и различий в биологических эффектах были разделены на следующие группы.

Производные прегнана:

1) прогестерон и его производные — медрогестон;

2) ретропрогестины — дидрогестерон;

3) производные 17-α-гидроксипрогестерона — гидроксипрогестрона капроат, медроксипрогестерона 17-ацетат, ингестрола ацетат, хлормадинона ацетат, ципротерона ацетат, демегестон, промегестон, тримегестон, гестенорона капроат, номегестрола ацетат.

Производные андростана и эстрана:

1) производные тестостерона — этистерон;

2) производные 19-нортестостерона — норэтистерона (или норэтинодрон), основное пролекарство норэтестрона — норэтистерона ацетат, линестеронол, этинодиола диацетат, норэтинодрел, тиболон, квингестранола ацетат;

3) производные норпрогестерона — левоноргестрел, гестоден, дезогестрел, норгестимат;

4) производные 17-α-гидроксинорпрогестерона — диеногест, норгестрирон, гестринон.

В последующие годы были получены новые стероиды с гестагеной активностью, часть из которых проходит доклинические или клинические испытания, а некоторые уже внедрены в клинику. В частности, появилась ещё одна группа гестагенов.

Производные спиронолактона: дроспиренон.

Новые оригинальные отечественные гестагены мецигестон и бутагест следует отнести, в соответствии с их химическим строением, к производным циклогексанпрогестерона и прогестерона соответственно.

К органам-мишеням и метаболическим системам, чувствительным к воздействию гестагенов, относятся: эндометрий, печень, молочные железы, кости, головной мозг, иммунная система, сердечно-сосудистая система, обмен липидов, обмен углеводов, обмен белков, в том числе компонентов системы гемостаза и фибринолиза, обмен воды и электролитов.

9.4.3. Молекулярные механизмы действия гестагенов. Для реализации специфической гестагенной активности все гестагены должны взаимодействовать с гестагенными рецепторами. Для этого обязательным является присутствие C_3-кетогруппы и двойной связи между углеродными атомами C_4 и C_5 кольца А. Для гестагенов в клетках тканей-мишеней имеются специфические участки связывания на плазматической мембране и внутри клетки (цитозоль/ядро), которые опосредуют быстрые (миллисекунды) и медленные (около часа) специфические биологические эффекты. Все гестагены вызывают даун-регуляцию эстрогенных рецепторов в тканях-мишенях и стимулируют метаболизм эстрадиола.

Для прогестерона выявлены две изоформы внутриклеточных рецепторов. У человека А-рецепторы (состоят из 933 аминокислотных остатка) отличаются от В-рецепторов отсутствием N-концевого участка, состоящего из 164 аминокислотных остатков. При наличии изоформ А и В в эквимолярных соотношениях может происходить их димеризация с образованием гомодимеров А/А, В/В и гетеродимеров А/В. Функция В-рецепторов заключается в активации специфических прогестерон-стимулируемых генов. А-рецепторы могут ингибировать активность В-рецепторов, причём не только В-рецепторов прогестерона, но и других классов стероидных гормонов, в частности рецепторов эстрогенов. Соотношение А- и В-рецепторов в тканях-мишенях для прогестерона определяет характер ответа при воздействии стероида. Известно, что экспрессия изоформ прогестиновых рецепторов изменяется во время менструального цикла. Отмеченная гетерогенность гестагенных рецепторов может объяснить как внутриндивидуальную, так и межиндивидуальную вариабельность эффектов гестагенов.

Кроме того, гестагены в той или иной степени могут взаимодействовать с рецепторами других стероидных гормонов (андрогенные, глюкокортикоидные, минералокортикоидные и в ряде случаев даже эстрогенные рецепторы) или других физиологически активных веществ (например, $ГАМК_А$- и глициновые рецепторы), формируя в каждом случае индивидуальный профиль фармакологической активности.

9.4.4. Показания к использованию гестагенов

Компенсация недостаточности жёлтого тела. Для клинического применения гестагенов имеется ряд показаний. Первичное показание к использованию гестагенов — восполнение дефицита эндогенного прогестерона при недостаточности жёлтого тела, которая может иметь место во время двух основных фаз жизни женщины, т. е. до или после середины жизни.

1. Первая фаза включает подростковый период после менархе до возраста 35–40 лет, когда наблюдается доминирование эстрогенов. При относительном превышении уровня эстрогенов по отношению к прогестерону наблюдается нарушение менструального цикла, предменструальный синдром (включает чувство переполнения и мастодинию), возникновение миом и мастопатии. Во всех этих случаях гестагены назначают ежедневно в течение 10–14 дней во вторую половину цикла, до тех пор пока перечисленные симптомы не исчезнут. При этом, если врач встречается с аменореей, прогестиновый тест — наилучший способ выяснения её причины. У жен-

щин с синдромом поликистозных яичников назначают гестагены без андрогенной активности.

2. Во вторую фазу жизни, начинающуюся в 45–48 лет, недостаточность жёлтого тела обычно сопровождается гипоэстрогенемией. В связи с этим в течение 20–21 дня каждого цикла следует принимать дозу гестагена, которая достаточна для антигонадотропного эффекта в сочетании с природным эстрогеном, так как этинилэстрадиол может оказывать нежелательное действие на сердечно-сосудистую систему.

Защита эндометрия. При проведении заместительной гормональной терапии у женщин с интактной маткой в обязательном порядке в течение 10 дней каждого цикла необходимо принимать гестаген в адекватной дозе для предотвращения гиперплазии эндометрия, вызываемой эстрогенами, принимаемыми в течение 21 дня. Если эстроген принимается в течение 28 дней, то продолжительность приёма гестагена увеличивают до 14 дней. В период постменопаузы комбинацию эстрогена с гестагеном принимают всегда без перерыва. Для этой цели обычно используют левоноргестрел (125 мкг), диеногест (2 мг), медроксипрогестерона ацетат (5 мг), ципротерона ацетат (1 мг), дирогестерон (10–20 мг) или норэтистерона ацетат (1 мг). У пожилых пациенток с высокой степенью гиперплазии эндометрия для её подавления требуются более высокие дозы гестагена.

Лечение эндометриоза. Гестагены очень эффективны для лечения симптомов эндометриоза и предотвращения его возврата. Для этой цели обычно используют гестагены без андрогенной активности (медроксипрогестерона ацетат, дидрогестерон) в течение длительного срока.

9.4.5. Экстрагенитальные эффекты гестагенов

Печень и метаболизм. Характер влияния гестагенов на обмен липидов зависит от наличия у них андрогенных свойств и в сочетании с эстрогенами они могут или не влиять на липолитическое действие эстрогенов или уменьшать его.

Влияние на углеводный обмен зависит от типа гестагена и его дозы. Гестагены с андрогенной активностью обычно сильнее снижают чувствительность тканей к инсулину (увеличивают резистентность к инсулину). Например, даже при трансдермальном введении норэтистерон подавляет способность эстрогенов повышать чувствительность к инсулину.

Гестагены при их непрерывном или прерывистом введении слабо или совсем не влияют на систему коагуляции и фибринолиза, что позволяет применять чисто гестагенные контрацептивы даже у женщин с высоким риском тромбоза. Прогестерон оказывает модулирующее действие на агрегацию тромбоцитов, проявляя атерогенные свойства, а постоянный приём левоноргестрела способствует активации тромбоцитов без усиления коагуляции.

Эстрогены снижают уровень инсулиноподобного фактора роста 1, но увеличивают синтез глобулина, связывающего половые гормоны, благодаря влиянию на печень, а гестагены без андрогенной или с антиандрогенной активностью не влияют на эти эффекты. В то же время гестагены с андрогенной активностью, такие как норэтистерона ацетат, подавляют данный эффект эстрогенов.

Недостаточность прогестерона — это первый признак наступающего прекращения функции яичников в период пременопаузы. Многие женщины страдают не столько от недостаточности эстрогенов, сколько от доминирования эстрогенной активности в этот период. Типичными ранними симптомами дефицита прогестерона являются отёки, веналгия и депрессии. Прогестерон и некторые гестагены (гестодлен) в особенности дроспиренон, подавляют эффект альдостерона.

Молочные железы. Приём гестагенов при мастопатии без атипической пролиферации позволяет уменьшить выраженность болевого синдрома. Примерно в 10%

случаев мастопатия сопровождается атипичной пролиферацией, которая увеличивает риск рака молочной железы. В этом случае целесообразность применения гестагенов не подтверждена и требует дополнительного изучения.

Ряд гестагенов (промегестон, немогестрола ацетат) дозозависимым образом ингибируют активность сульфатазы, которая канализует образование эстрогенов, что является обоснованием их использования для лечения эстрогензависимого рака молочной железы, а также для профилактики повышенного накопления эстрогенов в постменопаузе, так как именно в этот период происходит увеличение сульфатазной активности.

В настоящее время продолжает дискутироваться вопрос о роли гормонозаместительной терапии (эстроген + прогестин) в отношении риска развития рака молочной железы. В некоторых североамериканских исследованиях добавление гестагена (чаще гестаген без андрогенной активности — медроксипрогестерона ацетат) к терапии эстрогенами не увеличивало риска развития рака молочной железы. Однако следует отметить, что в Европе, в отличие от стран Северной Америки, применяют чаще гестагены с андрогенной активностью (левоноргестрел, норэтистерона ацетат), которые, подавляя влияние эстрогенов на инсулиноподобный фактор роста 1, могут косвенно влиять на пролиферативные процессы в молочной железе. Поэтому нужны дополнительные эпидемиологические исследования, которые бы ответили на вопрос о роли каждого гестагена в риске развития рака молочной железы.

У некоторых женщин, страдающих эпилепсией или мигренью, в период беременности наблюдается снижение симптомов этих заболеваний. Поэтому полагают, что у них гестагены имеют потенциальную способность быть полезными и в этом отношении. Гестагены служат препаратами выбора для лечения женщин с эстрогенной депрессией в период пери- и постменопаузы.

Иммунная система. Прогестерон защищает аллогенную яйцеклетку от иммуного отторжения. Увеличивая образование простагландина Е2, гестагены угнетают активность Т-лимфоцитов. Количество гестагенных рецепторов в лимфоцитах увеличивается в период нормальной беременности и уменьшается при аномальной. У женщин, которые принимали гестагены перед беременностью и в течение 12 недель после её начала, беременность протекала более благоприятно.

Сердечно-сосудистая система. За исключением дидрогестерона все гестагены повышают температуру тела дозозависимым образом. Всасывание прогрестерона, даже в микронизированной форме, после его перорального введения очень вариабельно и биодоступность невелика. В то же время синтетические гестагены, особенно производные андростана и эстрана, как правило, быстро всасываются и имеют высокую бидоступность, с максимумом концентрации в сыворотке в течение 2–5 ч.

Клиническое применение гестагенсодержащих препаратов. После открытия прогестерона в 1930-х гг. прошлого века гестагены (прогестины) начали широко применяться в медицинской практике, и за прошедшие годы показания к их применению значительно расширились, отражая получение новых данных о механизмах действия стероидных гормонов (табл. 9.6).

Для гормонозаместительной терапии (ЗГТ) чаще всего используют производные 17-α-гидроксипрогестерона (прогестерона), 19-норпрогестерона, а также 19-нортестостерона.

Производные прогестерона ближе по своим свойствам к эндогенному гормону, но они не обладают, как правило, достаточной биодоступностью. В то же время производные 19-нортестостерона, разделяющиеся на эстраны (норэстистерон, норэтинодрел) и гонаны (левоноргестрел, гестоден, норгестимат, дезогестрел), характеризуются высокой биодоступностью и рядом дополнительных свойств, которые могут быть желательны или нежелательны. В последние годы особый интерес стали

Таблица 9.6

Изменение показаний для применения прогестинов [7]

Год	Показание
1934	Применение у женщин после овариэктомии
1937	Лечение олиго- и гипоменореи
1938	Лечение ановуляции
1953	Лечение менорргии
1956	Контрацепция у женщин
1960	Лечение эндометриоза
1970-е	Применение при онкологических заболеваниях
1980-е	Заместительная гормонотерапия в постменопаузе
1990-е	Мужская контрацепция

представлять так называемые «гибридные» прогестины — норпрегнаны: промегестон (R 5020), номегестрол ацетат, тримегестон и производное андростана — дроспиренон. Эти прогестины объединяют в себе свойства природного прогестерона с таковыми современных 19-норпрогестинов. Общей структурной особенностью гибридных прогестинов является отсутствие 17-α-этинильной группы [1, 6]. Первым соединением в этой группе прогестинов является диеногест (17-α-цианометил-17-β-гидрокси-4,9-эстрадиен-3-он; код STS 5579) [19].

Как видно из данных, представленных в табл. 9.6, гестагены имеют достаточно большой перечень показаний. Их использование при проведении заместительной гормонотерапии (ЗГТ) у женщин с интактной маткой, являясь необходимым для защиты эндометрия от пролиферативного действия эстрогенов, привлекает особое внимание, так как от характера используемого гестагена самым существенным образом зависит не только спектр получаемых фармакологических эффектов, но и приемлемость (переносимость) препарата.

Выбор гестагена, его дозы и режима использования определяется его способностью эффективно защищать эндометрий, а также оказывать собственное влияние на обменные процессы в нужном направлении и способствовать улучшению самочувствия женщины, не противодействуя положительным эффектам эстрогенов в отношении профилактики и лечения остеопороза, предотвращения развития атеросклероза, болезни Альцгеймера и атрофических изменений слизистых и кожи,

В этом аспекте особый интерес вызывает новый гибридный гестаген диеногест, уникальность которого заключается в том, что в одной молекуле удалось объединить положительные свойства 19-норпрогестинов (высокая биодоступность при пероральном приёме, короткое время полужизни в сыворотке, выраженная способность вызывать трансформацию эндометрия, надёжно ингибировать овуляцию и хорошо контролировать цикл) и производных прогестерона (умеренное антигонадотропное действие, антиандрогенная активность). Кроме того, только диеногесту присущи такие свойства, как селективность по отношению к рецепторам прогестерона, отсутствие взаимодействия с глобулином, связывающим половые стероиды (ГСПС) и практическое отсутствие влияния на различные параметры метаболизма. Подтверждением таких уникальных свойств диеногеста в сравнении с другими современными гестагенами могут служить данные, представленные в табл. 9.7–9.9.

Способность различных гестагенов влиять на матку и яичники, отражённая в величине дозы, вызывающей трансформацию эндометрия (ТД), ингибирующей овуляцию, сдвигающей срок менструации, представлена в табл. 9.7.

Таблица 9.7

Дозы гестагенов, при которых имеет место трансформация эндометрия (ТД), ингибирование овуляции (ДИО) и сдвиг менструации (ДСМ)

Гестаген	ТД, мг	ДИО, мг/день	ДСМ, мг
Прогестерон (микронизированный)	2000	> 10	300–400
Норэтистерон	120	0,4	15
Норэтинодрел	50	0,5	7
Левоноргестрел	4	0,05	0,25
Хлормадинона ацетат	20	1,7	4
Медроксипрогестерона ацетат	50	20	15–20
Дидрогестерон	150	—	15
Ципротерона ацетат	20	1	4
Дезогестрел	2	0,06	0,15
Гестоден	2–3	0,03	0,075
Норгестимат	8	0,2	0,5
Диеногест	6	1	2

Помимо того, что диеногест обладает очень сильным прогестагенным влиянием на эндометрий, он полностью лишён эстрогенных, антиэстрогенных и андрогенных свойств. Антигонадотропное влияние, а именно подавление секреции ФСГ и ЛГ, выражено незначительно. У женщин с регулярным менструальным циклом необходимый антиовуляторный эффект достигается при использовании только 1 мг диеногеста в день, в основном благодаря периферическому воздействию — подавлению предовуляторного овариального пика 17-β-эстрадиола. Это препятствует положительному воздействию по механизму обратной связи на гипофиз и, таким образом, не возникают овуляторные пики ФСГ и ЛГ или же они являются отсроченными [21].

Основываясь на соотношении дозы, необходимой для подавления овуляции (мг в сутки), и дозы, вызывающей полноценную трансформацию эндометрия (мг на цикл, определённой в так называемом тесте Кауфмана), мы имеем следующий ряд прогестинов: норэтинодрон ацетат, левоноргестрел, гестоден с коэффициентом 1; дезогестрел и норгестмат с коэффициентом 3; ципротерона ацетат и хлормадинона ацетат с коэффициентом 5–7; в конце этого ряда находится диеногест с самым высоким коэффициентом 17. Таким образом, диеногест демонстрирует преобладание периферических эффектов, что означает благоприятное воздействие на эндометрий, близкое к природному прогестерону.

Фармакологические эффекты указанных гестагенов обусловлены их взаимодействием не только с гестагенными рецепторами, индуцируемыми эстрогенами, но и с рецепторами других стероидных гормонов.

Следует отметить, что сродство гормона к рецептору (табл. 9.8) само по себе не даёт возможности судить о характере фармакологического эффекта, так как в результате комплексообразования с рецептором стероид может его активировать или

ингибировать, т. е. быть агонистом или антагонистом. Кроме того, возможны случаи, когда стероид выступает в качестве частичного агониста или антагониста. Поэтому, имея данные только о сродстве того или иного гормона к определённому рецептору, нельзя говорить о характере его биологической активности *in vivo*. О последних можно судить только на целом организме с помощью специальных тестов. Результаты таких исследований в обобщённом виде представлены в табл. 9.9.

Таблица 9.8

Сродство гестагенов к цитозольным рецепторам стероидных гормонов различных классов (относительные величины)

Гестаген	Гестагенные рецепторы	Адрогенные рецепторы	Эстрогенные рецепторы	Глюкокортикоидные рецепторы	Минералокортикоидные рецепторы
Прогестерон	50	0	0	10	100
Хлормадинона ацетат	67	3	0	8	0
Ципротерона ацетат	90	6	0	6	8
Медроксипрогестерона ацетат	115	5	0	29	160
Норэтистерона ацетат	29	5	1	0	0
Гестоден	90	85	0	27	290
Левоноргестрел	150	45	0	2	70
3-Кетодезогестрел	150	20	0	14	0
Норгестимат	15	0	0	1	0
Диеногест	5	10	0	1	0

Приведённые результаты отражают лишь наличие того или иного эффекта у гестагенов, но не позволяют судить о его величине, которая определяется не только характером взаимодействия гормона с соответствующим рецептором, но и его фармакокинетикой, в частности биодоступностью, транспортом системой крови и метаболизмом. Кроме того, поскольку гестагены применяют в ЗГТ совместно с эстрогенами, важно оценивать действие препарата в совокупности, так как и гестагенный, и эстрогенный компоненты влияют на активность друг друга. Для ЗГТ особое значение имеет наличие у гестагена частичного андрогенного эффекта, так как он может противодействовать положительному влиянию эстрогенов на обмен липидов (табл. 9.9). Антиандрогенные свойства диеногеста заслуживают особого внимания, поскольку он является единственным производным 19-нортестостерона, имеющим чёткие, клинически выраженные антиандрогенные свойства.

При проведении ЗГТ положительное влияние эстрогенов на сердечно-сосудистую систему должно превалировать, приводя к снижению смертности женщин от сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому важны исследования, направленные на выяснение роли типа и дозы гестагена в действии ЗГТ на сердечно-сосудистую систему, так как имеются данные о существовании между гестагенами различий

Таблица 9.9

Фармакологические эффекты различных гестагенов [5]

Гестаген	Гестагенный	Эстрогенный	Антиэстрогенный	Андрогенный	Антиандрогенный
Прогестерон	+	–	+	+	+/–
Хлормадинона ацетат	+	–	+	–	+
Ципротерона ацетат	+	–	+	–	+
Дидрогестерон	+	–	+	–	–
Медроксипрогестерона ацетат	+	–	+	(+)	+
Норэтистерона ацетат	+	+	+	+	–
Левоноргестрел	+	+	+	+	–
Дезогестрел	+	–	+	+	–
Гестоден	+	–	+	+	–
Норгестимат	+	–	+	+	–
Диеногест	+	–	–	–	+

в этом отношении. Прогестерон, медроксипрогестерона ацетат, гестоден и 3-кетодезогестрел увеличивают экспрессию рецепторов тромбоцитов на гладкомышечных клетках аорты, а левоногестрел, норгестимат, норэтинодрен и этинилэстрадиол на неё не влияют.

В настоящее время изменились представления о способности гестагенов влиять на распределение жира у женщин в постменопаузе. Раньше считалось, что только эстрогены определяют характер распределения жира по женскому (гиноидному) типу и при возникновении недостатка эстрогенов оно начинает формироваться по мужскому (андроидному) типу. Однако после появления гестагенов с андрогенной или антиандрогенной активностью было доказано, что и гестагены с антиандрогенными свойствами заметно усиливают действие эстрогенов на обмен липидов. Оказалось, что использование диеногеста в составе препарата Климодиен (2 мг диеногеста и 2 мг эстрадиола валерата, непрерывный приём) позволяет добиться формирования распределения жира по женскому типу и не только улучшить здоровье, но и сохранить женственность. Учитывая уникальные свойства диеногеста как гестагена, объединяющего положительные эффекты производных прогестерона и 19-нортестостерона, он был подвергнут углублённым доклиническим и клиническим исследованиям, которые показали отсутствие у него мутагенности и канцерогенности, каких либо отрицательных влияний на обмен липидов и углеводов и в то же время отличную переносимость, тропность к эндометрию и способность в сочетании с эстрадиола валератом эффективно купировать климактерические симптомы, защищать костную ткань от резорбции.

Установлено, что после орального применения диеногест подвергается быстрому и почти полному всасыванию. Абсолютная биодоступность после орального использования составляет 90%. Подтверждением этому служит высокая метаболичесая стабильность при инкубации с микросомами печени человека [15].

Максимальная концентрация в плазме достигается примерно через 1–2 ч после применения [21]. Диеногест не связывается с ГСПС и транскортином. Таким образом, он не вытесняет тестостерон и кортизол из их участков связывания со специфическими транспортными белками. В плазме значительная часть диеногеста (10%) находится в свободном, не связанном состоянии, в то время как остальная часть (90%) неспецифично, относительно слабо связывается с сывороточным альбумином [9]. Такой характер биотранспорта диеногеста позволяет ему быстро и эффективно взаимодействовать с рецепторами тканей-мишеней, которых больше всего в эндометрии.

За исключением образования метаболита с ароматическим кольцом и 11-β-гидроксилированного соединения не было обнаружено никаких других продуктов биотрансформации диеногеста у человека. За 6 дней 86% от всей дозы диеногеста полностью выделяется с мочой и калом. Соотношение выделения с мочой и калом было 6,7 после приёма 101,3 мкг диеногеста на пациентку *per os* и 3,2 после орального применения из расчёта 0,1 мг на кг веса [21]. Период полужизни в плазме колеблется от 6,5 до 12 ч, т.е. является относительно коротким по сравнению с другими прогестинами [20]. Следовательно, при ежедневном приёме диеногест от 1 до 8 мг имеет определённые преимущества, так как кумуляция его очень незначительная и является контролируемой.

В исследованиях *in vitro* с использованием микросом печени человека в отличие от других 19-норпрогестинов и этинилэстрадиола диеногест не подавлял активности микросомального цитохрома P4503 A, оцениваемой по скорости окисления дигидропиридина [1]. Активность других изоэнзимов цитохрома P450 также не подавлялась диеногестом. Отсутствие влияния диеногеста на активность цитохрома P450 было подтверждено в исследованиях *in vivo* на человеке при изучении его воздействия на метаболизм кофеина и метамизола [21].

Для оценки возможности использования диеногеста для лечения эндометриоза использовали модель хирургической аутотрансплантации эндометриоидных имплантов с последующей овариэктомией. При этом диеногест оказался наиболее эффективным как для профилактики, так и для лечения экспериментально индуцированного у грызунов и кроликов эндометриоза, так как наблюдалось улучшение вызванных имплантами нарушений внутриклеточного метаболизма и показателей иммунитета [12]. Поэтому при проведении клинических испытаний диеногеста у больных с эндометриозом было принято во внимание, что механизм его действия может быть не просто прогестагенным, но и специфическим антипролиферативным [13]. Полученные клинические результаты свидетельствуют о том, что диеногест может применяться с целью уменьшения выраженности эндометриоидных гетеротопий и симптомов, типичных для клинической картины этого заболевания [17].

В 3 клинических работах после лечения 267 пациенток, страдавших эндометриозом, было чётко показано, что назначение 2 мг диеногеста в течение 6 месяцев было эффективно в отношении снижения выраженности дисменореи и тазовых болей, а также уменьшения или полного исчезновения эндометриоидных гетеротопий, как и применение даназола, аналогов гонадотропин-рилизинг гормона (Гн-РГ) и других прогестинов. Однако в отличие от других лекарственных средств диеногест характеризовался хорошей переносимостью и менее выраженными побочными эффектами [17].

Единственным неблагоприятным воздействием диеногеста были нерегулярные кровянистые выделения у некоторых пациенток, которые, однако, не вызывали у них большого беспокойства.

Как известно, наиболее важным побочным эффектом Гн-РГ является потеря минеральной плотности костной ткани. Поэтому в исследовании на грызунах оценивали

влияние диеногеста, бусерелина и комбинации диеногест + бусерелин на костную ткань. В то время как бусерелин значительно снижал минеральную плотность дистального отдела бедренной кости, введение только диеногеста или его комбинации с бусерелином существенно не влияла на минеральную плотность костной ткани, которая оставалась на прежнем уровне [10].

При проведении мультицентровых открытых рандомизированных исследований у 140 пациенток с эндометриозом II–IV степени, получавших 1 мг диеногеста в день в течение 4 месяцев или агонист Гн–РГ трипторелин (3,75 мг, один раз в 4 недели) выявлена одинаковая терапевтическая эффективность обоих режимов, но диеногест переносился пациентками лучше, так как агонисты Гн-РГ вызывают приливы жара [21]. Во время лечения лепроидом ацетатом 67,8% пациенток жаловались на такие приливы.

При терапии даназолом отмечаются значительные андрогенные побочные эффекты, такие как акне (в 54% случаев), повышенная сальность кожи и волос (в 48% случаев). Характеризуясь низкой частотой побочных реакций, диеногест в этом отношении был сравним только с гестриноном [21]. Однако в отличие от последнего на фоне приёма диеногеста произошло снижение проявления акне у 10% женщин, которые их имели. Результаты этих работ свидетельствуют о том, что диеногест является хорошей альтернативой другим препаратам, применяющимся для лечения эндометриоза.

Следует подчеркнуть, что большинство прогестинов, которые применяют для лечения эндометриоза, в этом случае должны быть использованы в более высоких дозах, чем в составе комбинированных пероральных контрацептивов (КПК) или препаратов для ЗГТ [22]. Это относится к норэтистерону ацетату, дидрогестерону и медроксипрогестерону ацетату [21] (табл. 9.10).

Таблица 9.10

Сравнение терапевтических доз гестагенов, используемых для лечения эндометриоза, с таковыми, применяемыми в КПК и препаратах для ЗГТ [21]

Прогестины	Эндометриоз (мг/сут)	КПК или ЗГТ (мг/сут)
Норэтистерона ацетат	10–20	0,5–1,0
Линестренол	5–7,5	0,75–2,5
Дидрогестерон	10–60	10,0–20,0
Медроксипрогестерона ацетат	10–50	2,5–5,0
Диеногест	2	2

В противоположность этому, диеногест является первым прогестином, который может быть использован в низкой дозе для лечения эндометриоза (всего 2 мг/сут), что указывает на высокую тропность диеногеста к эндометрию. Повышение его дозы до 10 мг дважды в день не усиливало клинической эффективности, хотя и не наблюдалось ухудшения переносимости препарата. Побочные эффекты при приёме диеногеста наблюдались крайне редко. Наоборот, по данным стандартизированного опросника, он значительно улучшал общее самочувствие [21].

Благоприятные отличительные черты диеногеста как прогестина в составе заместительной гормональной терапии у женщин в постменопаузе определяются прежде всего его преимущественной тропностью к эндометрию [2], антипролиферативным

влиянием [11], а также отсутствием антиэстрогенных эффектов, в результате чего он не противодействует сосудорасширяющему влиянию эстрогенов [18].

Благодаря своим уникальным свойствам диеногест является препаратом выбора среди других прогестинов, использующихся в ЗГТ. Это было доказано в ряде клинических работ, где диеногест применяли в комбинации с 2 мг эстрадиола валерата в составе препарата Климодиен в непрерывном комбинированном режиме ЗГТ [4]. Важно подчеркнуть, что оптимальной дозой диеногеста, которая обеспечивает надёжную защиту эндометрия, является 2 мг: в дозе 0,5 или 1 мг его протекторный эффект в отношении эндометрия недостаточен, а в дозе 3 или 4 мг он такой же, как и в дозе, равной 2 мг.

В исследованиях на 1500 женщинах при проведении третьей фазы клинических испытаний выявлено, что комбинация диеногест + эстрадиола валерат приводит к снижению индекса Купермана с 17,9 до 3,8 в течение 12 циклов терапии. По этому показателю данная комбинация имела такую же эффективность, что и препарат сравнения Клиогест (норэтситерона ацетат + эстрадиола валерат).

Выраженный утеротропный эффект диеногеста и высокая безопасность Климодиена в отношении влияния на эндометрий были продемонстрированы в клинических исследованиях. После 12 месяцев его применения у 87,8% пациенток отмечалась атрофия эндометрия. При исследовании эндометрия не было отмечено ни одного случая его гиперплазии. Непрерывный комбинированный режим терапии был предложен для того, чтобы повысить комплаентность ЗГТ, так как такой режим предполагает отсутствие менструальноподобной реакции. В этом отношении Климодиен показал прекрасные свойства: почти у 78% женщин после 6 месяцев, а у 85% после 12 месяцев его применения прорывные кровотечения отсутствовали. Важно подчеркнуть, что по своему влиянию на характер маточных кровотечений Климодиен сходен с Клиогестом, но выгодно отличается от него по влиянию на обменные процессы.

Защитное воздействие ЗГТ на сердечно-сосудистую систему частично объясняется влиянием природных эстрогенов на липидный профиль. В комбинированных препаратах прогестагенный компонент не должен снижать этот эффект эстрогенов. Именно так действует диеногеста ацетат, но не норэтистерона ацетат. В клинических исследованиях Климодиен значительно снижал уровень общего и холестерина ЛПНП, в то время как содержание холестерина ЛПВП увеличилось, т. е. изменения были благоприятными для сердечно-сосудистой системы. В то же время Клиогест даже снижал уровень холестерина ЛПВП.

Другой механизм защитного воздействия ЗГТ определяется прямым влиянием эстрогенов на сосудистую стенку. Доказано, что эстрадиол действует как антагонист кальция, вызывая прямой сосудорасширяющий эффект. На изолированных клетках сосудов человека было показано, что в отличие от норэтистерона ацетата диеногест не противодействовал этому влиянию эстрогенов [18]. В экспериментальных исследованиях на женских особях обезьян диеногест по сравнению с медроксипрогестерона ацетатом оказывал менее выраженное влияние на агрегацию тромбоцитов и коагуляцию [10]. В клинических условиях при приёме Климодиена отмечалось увеличение содержания маркёров вазодилатации в моче, а при прямом сравнении с «чистым» эстрадиолом не было выявлено никаких отличий [18].

Результаты доклинических исследований, включая эксперименты *in vivo*, свидетельствуют об антипролиферативном действии диеногеста на раковые клетки молочной железы, [11]; в настоящее время они подтверждаются данными клинических испытаний. Возможно, что в механизме этого очень важного эффекта диеногеста имеет значение его способность уменьшать уровень инсулиноподобного фактора роста [3], что не свойственно другим гестагенам.

В результате недавно законченных клинических исследований выявлены другие благоприятные эффекты Климодиена. У пациенток в постменопаузе, страдающих бессонницей, Климодиен улучшал качество сна, а также общее психофизическое состояние, выразившееся в улучшение познавательной функции, способности концентрировать внимание [21].

Таким образом, можно заключить, что комбинация эстрадиола валерата с диеногестом (Климодиен) является очень эффективным средством для лечения климактерических расстройств.

Диеногест является первым из так называемых «гибридных» прогестинов, объединяя в себе типичные фармакодинамические свойства производных прогестерона (превосходная переносимость, антиандрогенное воздействие, низкая антигонадотропная активность, преимущественно периферический механизм действия, низкий уровень прохождения через кожу, низкая доза) со свойствами современных 19-норпрогестинов, содержащих 17-α-этинильную группу (сильное прогестагенное влияние на эндометрий, короткий период полужизни, высокая биодоступность при приёме *per os*, слабое воздействие на печень, отсутствие токсических и генотоксических свойств, хороший контроль менструального цикла в комбинации с эстрогенами) [3, 8]. Таким образом, применение диеногеста в составе Климодиена открывает новые возможности в проведении ЗГТ в непрерывном режиме. Теперь женщины в постменопазуе могут принимать препарат, который не только помогает устранить симптомы климактерических расстройств, обеспечить лечение и профилактику остеопороза и сердечно-сосудистых заболеваний, но и способствует сохранению их женственности (улучшение состояние кожи и волос, распределение жира по женскому типу).

К другому виду медицинского применения гестагенов относится их использование в составе гормональных контрацептивов. Создание таких препаратов более сорока лет лет тому назад стало эпохальным событием в истории человечества и привело к существенному изменению многих аспектов социальной жизни, включая здоровье женщины, уровень рождаемости, планирование семьи и др. Однако, несмотря на успешное и всё более расширяющееся использование гормональных препаратов для целей предохранения от нежелательной беременности (в некоторых развитых странах процент женщин, которые принимают низкодозированные гормональные контрацептивы, превышает 50%), продолжаются исследования механизмов их действия и внедрение новых препаратов, создаваемых как путём синтеза новых гормональных соединений, так и с помощью поиска новых комбинаций и дозировок уже известных гестагенов и эстрогенов [13].

Разработка первых гормональных контрацептивов началась в 1950-х гг. на основании имевшихся уже в то время сведений о подавлении овуляции во время беременности и о том, что данный эффект обусловлен прогестероном. В 1952 г. были получены синтетические гестагены, пригодные для применения у людей, и в конце пятидесятых годов начались клинические испытания этих препаратов в аспекте их способности ингибировать овуляцию и предотвращать беременность.

Было обнаружено, что как гестагены, так и эстрогены в отдельности способны ингибировать секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) и тем самым подавлять овуляцию. Однако при совместном использовании гестагена и эстрогена в одной таблетке имеет место значительное увеличение их антигонадотропного действия (потенцирование эффекта, приводящего к ингибированию овуляции), что обосновывает целесообразность применения комбинированных средств в большинстве случаев [11].

Ингибирование секреции гипофизарных гормонов обусловлено как действием гестагенов и эстрогенов на гипоталамус, сопровождающимся подавлением секреции

релизинг-факторов гонадотропинов (РГГ), так и их прямым действием на гипофиз, выражающимся в уменьшении его чувствительности к воздействию РГГ.

При введении одной таблетки комбинированного гормонального контрацептива сразу же происходит уменьшение уровня ФСГ и ЛГ в крови, но для подавления овуляции необходим ежедневный приём контрацептивного препарата в течение 7 дней. Для имитирования 28-дневного менструального цикла гормональные контрацептивы следует принимать в течение 21 дня, делая 7-дневный перерыв. В это время наблюдается развитие фолликулов. Восстановление секреции ФСГ и ЛГ происходит сразу же на следующий день после прекращения приёма контрацептива, благодаря чему имеет место риск возникновения беременности даже при однократном пропуске приёма препарата (он тем меньше, чем более высокой гормональной активностью обладают входящие в состав контрацептива гестоген и эстроген). В любой момент, прекратив приём контрацептивного средства, можно быстро восстановить фертильность. Современные комбинированные гормональные контрацептивы наряду с ингибированием овуляции обладают также другими эффектами, способствующими предотвращению возникновения беременности. К ним относятся увеличение вязкости слизи в шейке матки (данный эффект обусловлен гестагенами) и влияние на эндометрий (комбинация экзогенных гестагена и эстрогена снижает способность эндогенных гормонов вызывать изменения в эндометрии, которые необходимы для имплантации).

Все современные гормональные контрацептивы можно разделить на гестагенные и комбинированные гестаген-эстрогенные препараты.

Препараты, содержащие только гестаген, по сравнению с комбинированными гормональными средствами в меньшей степени подавляют овуляцию (приблизительно у 40% женщин, применяющих гестагенную контрацепцию, имеет место овуляция). Поэтому считается, что важное значение в контрацептивном действии чисто гестагенных препаратов имеет увеличение вязкости цервикальной слизи, затрудняющее попадание сперматозоидов в полость матки. Даже в редких случаях, когда сперма проникает в полость матки, подвижность сперматозоидов оказывается пониженной и вероятность оплодотворения яйцеклетки близка к нулю. Кроме того, гестагены уменьшают число и диаметр желёз в эндометрии, а также толщину эндометрия, что снижает возможность имплантации.

Оральные гестагенные контрацептивы (например, препарат Микролют) часто назначают кормящим женщинам, а также женщинам, имеющих противопоказания к назначению эстрогенов. Основная причина этого заключается в том, что при его использовании концентрация гормона, выделяемого с грудным молоком, минимальна и практически не оказывает влияния на младенца. При грудном вскармливании, как правило, наблюдается аменорея и подавление функции яичников, овуляция маловероятна и повышенная вязкость цервикальной слизи затрудняет проникновение спермы в полость матки. Всё это потенцирует контрацептивный эффект гестагенов в период лактации.

В последние годы довольно большое распространение получили парентеральные гестагенные контрацептивные препараты: инъекционные, имплантационные и внутриматочные. Гестагенные парентеральные контрацептивы показаны женщинам, которые недостаточно хорошо переносят пероральный приём комбинированных гормональных средств, или которые недостаточно внимательны, чтобы строго соблюдать режим ежедневного приёма препарата. К преимуществам парентеральных контрацептивов следует отнести возможность использования их в более низких дозах, чем при приёме внутрь, так как исключается их частичный метаболизм при первичном прохождении через печень. Во многих странах мира хорошо зарекомендовал себя имплантационный препарат Норплант (6 капсул, каждая из которые содержит 36 мг левоноргестрела), позволяющий иметь надёжную контрацепцию в течение 5 лет.

Однако принципиально новым достижением в ряду гестагенных препаратов следует признать разработку внутриматочной системы Мирена, которая содержит контейнер с гестагеном левоноргестрелом (52 мг), — постепенно высвобождаясь из него, гормон оказывает местное воздействие на матку. Мирена сочетает в себе преимущества внутриматочных спиралей и гормональных контрацептивов, но при этом имеет явные преимущества: по сравнению с пероральными контрацептивами требуется в меньшая доза гормона (ежедневная доза самого низкодозированного гестагенного перорального препарата Микролюта составляет 30 мкг, а при использовании Мирены ежедневно высвобождается 20 мкг левоноргестрела в течение 5 лет); по сравнению с внутриматочными медьсодержащими спиралями Мирена не вызывает воспалительных реакций в эндометрии и значительно уменьшает интенсивность менструальных кровотечений и частоту дисменореи. Мирена приобретает всё большую популярность, особенно у рожавших женщин и у женщин позднего репродуктивного возраста, когда особенно важно стремление к уменьшению доз гормонов в используемых средствах для контрацепции. В настоящее время в мире таким методом контарцепции успешно пользуются уже 1,5 млн женщин При этом важно, что левоноргестрел, входящий в состав указанных препаратов, защищает женщин от остеопороза, в отличие от другого гестагена медроксипрогестерона ацетата (Депо-Провера).

Вместе с тем в настоящее время большинство женщин для целей контрацепции предпочитает применять комбинированные гормональные пероральные средства, как наиболее надёжные, удобные (хорошо контролирующие менструальный цикл) и доступные.

Если в качестве эстрогенного компонента практически у всех современных КПК используют этинилэстрадиол, то химическая структура гестагенного компонента различна. Именно от природы гестагена в основном зависят как величина ингибирования овуляции и увеличение вязкости слизи шейки матки (эти эффекты обусловливают предохранение от нежелательной беременности), так и дополнительные эффекты: контроль менструального цикла, изменение обмена липидов, углеводов, белков, андрогенов и другие, которые определяют индивидуальные характеристики препарата и создают возможность оптимального выбора в каждом конкретном случае.

Кроме различий, всем гестагенам присущи общие свойства, которые выражаются в снижении числа эстрогенных рецепторов и стимуляции метаболизма эстрогенов. Все гестагены, за исключением дидрогестерона, дозозависимым образом увеличивают температуру тела. Реализация биологической активности обусловлена их связыванием с цитозольными/ядерными гестагенными рецепторами (эффект развивается примерно через 1 ч), а также взаимодействием с мембранными гестагенными рецепторами (эффекты развиваются быстро) [20].

Среди современных гестагенов третьего поколения наиболее сильным и избирательным по своему специфическому фармакологическому действию является гестоден; его создание позволило снизить дозу гестагенного компонента до самой низкой величины [1, 5, 11]. Гестоден в дозе 75 мкг в сочетании с этинилэстардиолом (30 или 20 мкг) входит в состав монофазных препаратов Фемоден и Логест, разработанных учёными концерна Schering AG (Германия) — всемирно известного лидера в области разработки, производства и внедрения в клиническую практику гормональных стероидных средств. Гестоден также входит в состав трёхфазного препарата Милване и оригинального монофазного комбинированного контрацептива Mirelle (каждая из 24 таблеток содержит 60 мкг гестодена и 15 мкг этинилэстрадиола), также нашедших широкое применение.

Безопасность и высокая эффективность гестоденсодержащих препаратов была доказана в многочисленных доклинических и клинических испытаниях [16, 23, 24, 26]. Фармакологическим обоснованием возможности создания Логеста, как сверх-

низкодозированного комбинированного орального контрацептива, является то, что у добровольцев ежедневная доза гестодена, необходимая для подавления овуляции (основного механизма, обусловливающего контрацептивный эффект), является наименьшей — 0,03 мг/день, по сравнению с другими гестагенами, используемыми в современных гормональных контрацептивах: дезогестрелом (0,06 мг/день), норгестиматом (0,2 мг/день), левоноргестрелом (0,05 мг/день) и норэтистерона ацетатом (0,5 мг/день) [25]. При этом следует подчеркнуть, что именно эти данные отражают истинную активность перечисленных гестагенов, так как они получены в целом организме, а не в экспериментах *in vitro*. Однако в ряде статей при сравнении гестагенов используются именно данные *in vitro*, причём полученные на тканях экспериментальных животных, а не человека. Эти данные используются для обоснования преимущественного выбора того или иного контрацептивного средства, причём не только с точки зрения контрацептивной эффективности КПК и их переносимости, но и наличия у них дополнительных лечебных эффектов (терапия андрогензависимых заболеваний, предохранение от злокачественных и воспалительных заболеваний эндометрия и др.). В связи с этим мы считаем целесообразным обратиться к фармако-биохимическим результатам сравнительного изучения современных гестагенов, используемых в гормональных контрацептивах. Наибольший интерес представляют гестагены третьего поколения — гестоден и дезогестрел. Согласно современным представлениям о фармакодинамике и фармакокинетике, реализация биологической активности любого лекарственного средства определяется не только сродством к тем или иным рецепторам, но и внутренней активностью (т. е. способностью вызывать видимую фармакологическую реакцию), а также достаточной биодоступностью (т. е. способностью достигать участка действия (рецептора) из места его введения (в случае гормональных комбинированных контрацептивов — желудочно-кишечного тракта) [22].

Поскольку гестоден активен сам по себе и обладает практически 100%-й биодоступностью, а дезогестрел проявляет свою активность только в виде метаболита 3-кето-дезогестрела и обладает примерно 60%-й биодоступностью, обычно в сравнительных экспериментах используют 3-кето-дезогестрел и гестоден. В работе [15] о рецепторотропной активности гестодена, 3-дезогестрела и прогестерона судили по их способности конкурировать с 3H-R1881 (метилтриенолон), 3H-альдостерона, 3H-прогестерона и 3H-эстрадиола и 3H-дексаметазона за связывание с андрогенными рецепторами простаты кастрированных крыс, минералокортикоидными рецепторами клеток COS-1 (содержат рецепторы человека), прогестероновыми рецепторами матки половозрелых крольчих, эстрогенными рецепторами матки овариэктомированных крыс и глюкокортикоидными рецепторами тимуса крыс самок соответственно. Полученные результаты представлены в табл. 9.11.

Таблица 9.11

Относительное сродство (в %) гестодена, 3-кето-дезогестрела и прогестерона к цитозольным рецепторам стероидных гормонов

Прогестины	Прогестероновые рецепторы	Адрогенные рецепторы	Глюкокортикоидные рецепторы	Минералокортикоидные рецепторы	Эстрогенные рецепторы
Гестоден	125	33	56	11	0
3-кето-дезогестрел	125	16	40	0,5	0
Прогестерон	100	2	11	100	0

Видно, что гестоден и 3-кето-дезогестрел имеют более высокое сродство к прогестероновым рецепторам, чем сам прогестерон. Оба производных 19-нортестостерона проявляли заметное сродство к андрогенным рецепторам простаты и глюкокортикоидным рецепторам тимуса; прогестерон в этом отношении был менее активен. Гестоден и 3-кето-дезогестерл сильно отличались в отношении тропности к минералокортикидным рецепторам; в этом случае гестоден имеет сходство с прогестероном. Ни одно из испытуемых соединений не имеют сродства к эстрогенным рецепторам. Если использовать только эти данные и на их основании делать выводы о преимуществе того или иного препарата, рассчитывая индексы андрогенности, то можно сделать неправильные выводы, как это имеет место, например в работах [3, 18]. Однако, как уже отмечалось, сам по себе факт связывания ещё не говорит о том, будут ли рецепторы активированы или ингибированы. Поэтому U. Fuhrmann и др. (1995) провели дополнительное исследование, направленное на выяснение способности изучаемых гормонов активировать рецепторы андрогенов, глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Это можно сделать, оценив степени индукции рецепторопосредуемой транскрипции. Обнаружено, что в клетках CV-1, содержащих андрогенные рецепторы крысы, R1881 (агонист андрогенных рецепторов) их стимулирует, а прогестерон на их функциональную активность не влияет. 3-Кето-дезогестрел стимулировал андрогенные рецепторы в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М сильнее, чем гестоден (заметим, что именно эти данные отражают истинную андрогенную активность стероидов, в отличие от данных по связывание с рецепторами). При оценке андрогенной активности гестагенов в целом организме (мыши) не найдено различий между гестоденом и дезогестрелом (пролекарство 3-кето-дезогестрела) в их способности стимулировать активность андрогензависимого фермента β-глюкуронидазы в почках [8]. Несмотря на то что дезогестрел и гестоден имеют небольшую адрогеноподобную активность, их комбинация с этинилэстрадиолом *in vivo* характеризуется выраженным антиандрогенным действием благодаря индукции синтеза глобулина, связывающего половые стероиды, и ингибированию выработки гонадотропинов, стимулирующих синтез адрогенов в яичниках.

Приведённые факты свидетельствуют о том, что оценка андрогенных свойств гестагенов самих по себе вообще не может дать правильной информации об андрогенной активности комбинированного препарата — гестагена и эстрогена. При этом, если сравнивать преимущества или недостатки дезогестрелсодержащих и гестоденсодержащих КПК в отношении их эффективности для лечения гиперандрогиний, не следует забывать, что в показаниях по их применению нет таких заболеваний, как акне, гирсутизм, андрогенетическая алопеция или себорея, но такие показания есть у комбинированного гормонального препарата Диане-35, содержащего ципротерона ацетат. Это уникальный гестаген, одновременно обладающий антиандрогенной активностью, проявляющейся в блокировании андрогенных рецепторов и активности α-редуктазы, катализирующей превращение тестостерона в более активный андроген дигидротестостерон. В сочетании с этинилэстрадиолом ципротерона ацетат, так же как и другие комбинированные контрацептивы, повышает уровень глобулина, связывающего половые стероиды, и ингибирует выработку гонадотропинов гипофизом, что приводит к уменьшению как общей, так и свободной концентрации андрогенов. В многочисленных рандомизированных сравнительных клинических исследованиях статистически достоверно доказана более высокая антиандрогенная активность препарата Диане-35 по сравнению с другими КПК, в том числе и с дезогестрелсодержащими препаратами [14]. Именно поэтому утверждение о том, что любой другой из разрешённых в России КПК, кроме Диане-35, может быт препаратом выбора у женщин, страдающих акне и себореей, противоречит утверждённым инструкциям по применению КПК МЗ РФ. Мы специально уделяем внимание этому положению, так

как время от времени в печати появляются материалы, в которых некоторые КПК, чаще всего дезогестрелсодержащие препараты, рекомендуются даже как препараты выбора для подростков и молодых женщин с акне и себореей [3].

Рассматривая другие свойства современных гестагенов, следует отметить, что гестоден и 3-кето-дезогестрел примерно сходным образом активируют рецепторы глюкокортикоидов человека; этот их эффект был слабее дексаметазона, но сильнее прогестерона. Несмотря на заметное сродство 3-кето-дезогестрела и гестодена к глюкокортикоидным рецепторам, их глюкокортикоидная активность *in vivo*, определяемая по инволюции тимуса у крыс, была пренебрежимо мала (в 3000 раз слабее дексаметазона). Подобно прогестерону гестоден ингибирует индукцию альдостероном транскрипции в клетках COS-1, содержащих минералокортикоидные рецепторы человека, а 3-кето-дезогестрел в этом отношении не активен [15]. При этом сам гестоден не активирует минералокортикоидные рецепторы. В сродстве 3-кето-дезогестрела и гестодена к гестагенным рецепторам человека, кроликов и грызунов существует видовые различия. Таким образом, приведённые данные свидетельствуют о наибольшем сходстве фармакологических свойств гестодена из исследуемых синтетических гестагенов производных 19-нортестостерона с прогестероном. Наличие только у гестодена антиминералокортикоидного действия, по-видимому, может объяснить меньшую частоту возникновения таких побочных эффектов, как напряжение в молочных железах и головные боли, гестоденсодержащих препаратов по сравнению с дезогестрелсодержащими контрацептивами.

Как известно, при совместном использовании эстрогена и гестагена имеет место их взаимное влияние на уровень рецепторов друг друга. Поэтому рассмотрение свойств эстрогенного и гестагенного компонентов отдельно не даёт возможности предсказать точно характер фармакологической активности комбинации указанных гормонов. В частности, в комбинированных контрацептивах характер влияния гестагена на уровень и функциональную активность эстрогенных рецепторов в клетках-мишенях в значительной мере определяет сбалансированность гормональных эффектов. В этой связи интересно, что гестоден обладает выраженными антиэстрогенными свойствами в клетках эндометрия, тем самым нейтрализуя нежелательные метаболические эффекты эстрогенов. При сравнительном исследовании способности различных гестагенов (норэтистерон, норэтинодрел, норгестрел, левоноргестрел, дезогестрел, гестоден) изменять активность α- и β-эстрогенных рецепторов в культуре клеток COS-7 обнаружено, что норэтистерон, норэтинодрел и дезогестрел стимулируют α-эстрогенные рецепторы, а норгестрел, левоноргестрел, норэтинодрел и норэтистерон — активность β-эстрогенных рецепторов [10]. Единственный гестоген, который не влиял на активность эстрогенных рецепторов в этих клетках, был гестоден. Учитывая тот факт, что стимуляция эстрогенных рецепторов рассматривается как фактор риска развития рака молочной железы, эти данные свидетельствуют о наибольшей безопасности среди изученных гестагенов гестодена в аспекте способности влиять на пролиферацию клеток-мишеней. Подтверждением этому могут служить данные о способности гестодена дозозависимым образом ингибировать рост клеток рака молочной железы человека [5].

Однако самое уникальное свойство гестодена заключается в его 100%-й биодоступности, так как в отличие от дезогестрела и норгестимата нет необходимости его превращения в активные метаболиты [4]. Благодаря этим особенностям фармакологических свойств обеспечивается более предсказуемая концентрация гестодена в крови, и тем самым снижается возможный риск передозировки или, наоборот, недостаточной дозировки препарата, особенно у женщин с низкой или высокой скоростью метаболизма. Высокая биодоступность гестодена очень важна также потому, что только стабильный уровень препарата в крови может обеспечить хороший кон-

троль менструального цикла. Проведённые клинические исследования действительно показали, что препараты, содержащие гестоден в сочетании с этинилэстрадиолом даже в дозе, в 2–3 раза меньшей по сравнению с дезогестрел- и норгестиматсодержащими препаратами (Фемоден и Логест содержат в своём составе 75 мкг гестодена, Марвелон и Мерсилон — 150 мкг дезогестрела, а Силест — 225 мкг норгестимата), лучше обеспечивают контроль менструального цикла и меньше вызывают побочных эффектов, таких как головная боль, меноррагия, тошнота, рвота, напряжение в молочных железах и др [11].

Изучение эффективности подавления овуляции у 53 женщин, применявших как препараты, содержащие 20 мкг этинилэстрадиола и 75 мкг гестодена, так и 20 мкг этинилэстрадиола и 150 мкг дезогестрела, в течение 3 циклов, не выявило ни одного случая овуляции в обеих группах [7]. Исследование активности яичников проводилось путём измерения уровней эстрадиола, прогестерона, ЛГ и ФСГ в сыворотке крови, а также размера фолликула с помощью сонографии. При этом у большинства женщин не было отмечено функциональной активности яичников, что свидетельствует об эффективном и надёжном предохранении от беременности в различных возрастных группах.

Специальной задачей было изучение влияния нарушения режима приёма Логеста на развитие фолликулов, что имитировалось пропуском приёма драже в начале цикла. Результаты показали, что хотя пропуск драже усиливает развитие фолликулов в группе, получавшей 20 мкг этинилэстрадиола, по сравнению с группой, получавшей монофазный препарат с 30 мкг этинилэстрадиола, или с группой, получавшей трёхфазный препарат с 30–40 мкг этинилэстрадиола, овуляции не происходит [9].

Важно подчеркнуть, что снижение дозы этинилэстрадиола до 20 мкг в комбинации с гестоденом не снижает надёжности контрацептивного эффекта комбинированного гормонального средства [11]. Этот клинический факт, однако, нельзя переносить на оральные контрацептивы, содержащие другие гестагены.

Для соблюдения женщиной режима приёма орального контрацептивного средства и снижения числа отказов от дальнейшего его использования очень важным является способность препарата обеспечивать хороший контроль менструального цикла, в особенности низкую частоту межменструальных кровянистых выделений [12]. Результаты многочисленных клинических исследований продемонстрировали хороший контроль менструального цикла при назначении препарата, содержащего 20 мкг этинилэстрадиола в комбинации с 75 мкг гестодена [26]. Кроме того, было отмечено, что он оказывает положительное влияние на проявления дисменореи. Первичная дисменорея является распространённым симптомом и в постпубертатном периоде отмечается у 50% женщин, особенно у подростков. Показано, что применение Логеста оказывает значительное положительное влияние на частоту и выраженность проявлений дисменореи. Так, перед началом исследования, которое включало 670 женщин, получавших этот препарат в течение 3 лет, симптомы дисменореи отмечали 62 женщины, из них у 59 (95%) её проявления полностью исчезли, одна отметила улучшение и у двух не было изменений. В течение исследования только у 8 женщин появились симптомы дисменореи (1,2%) [12].

Сходные данные были получены в результате сравнительного исследования, проведённого в течение 1 года в двух группах женщин, получавших Логест и Мерсилон. Проявления дисменореи одинаково хорошо купировались у женщин, которые отмечали эти симптомы до начала приёма, в обеих группах. Однако сравнительный анализ выявил значительные различия между группами женщин в отношении развития дисменореи в процессе приёма контрацептивных средств. В то время как только у 5,5% женщин появились симптомы дисменореи на фоне приёма препарата, содержащего гестоден, в группе женщин, получавших дезогестрел, эта величина составила 15,1%

($p = 0{,}001$). В общей сложности частота дисменореи среди женщин, получавших препарат, содержащий гестоден, снизилась с 24,3% (перед началом лечения) до 14,2% (совокупность случаев, в которых дисменорея не купировалась и возникших впервые на фоне приёма препарата), в то время как в группе женщин, получавших препарат, содержащий дезогестрел, этот показатель возрос с 20,1% до 21,5%.

На более высокую способность Логеста по сравнению с Мерсилоном обеспечивать контроль цикла указывают данные о статически достоверном более низком уровне прогестерона и эстрадиола в крови женщин, принимавших отмеченные препараты [11].

Было показано, что частота «мажущих» кровянистых выделений и прорывных кровотечений у 479 женщин в течение 1 года наблюдения была низкой при использовании обоих препаратов, содержащих 20 мкг этинилэстрадиола, а в качестве прогестагенов — 75 мкг гестодена или 150 мкг дезогестрела. Согласно 3-летнему исследованию препарата, содержащего гестоден, частота межменструальных кровянистых выделений также снижалась, особенно в первые три цикла лечения. В целом, полученные данные свидетельствуют о лучшем контроле менструального цикла при использовании гестодена. Так к 3-му циклу приёма препаратов частота «мажущих» кровянистых выделений в группе женщин, принимавших гестоден, снизилась до 11,3% (в группе, получавшей дезогестрел (20/150) — до 13,4%), а частота прорывных кровотечений уменьшилась, соответственно, до 1,5% и 3,8% [9]. При сравнительно исследовании у 2419 женщин (возраст меньше 41 года), принимающих монофазный гестоден (30 мкг этинилэстрадиола/ 75 мкг гестодена), трёхфазный гестоден (30 мкг этнилэстрадиола/50 мкг гестодена в течение 6 дней; 40 мкг этинилэстрадиола/70 мкг гестодена в течение 5 дней и 30 мкг этинилэстрадиола/100 мкг гестодена в течение 10 дней) или монофозный дезогестрел (20 мкг этинилэстрадиола/150 мкн дезогестрела) в течение 13 циклов выявлено, что количество женщин, имеющих прорывные межменструальные или мажущие кровотечения, в случае использования дезогестрелового препарата примерно 2 раза выше, чем в случае использования гестоденсодержащих контрацептивов. Частота побочных эффектов (головные боли, тошнота, боли в молочных железах и желудке) во всех случаях были примерно одинаковыми и составляли от 14,2% до 3,5%, а метроррагия чаще встречалась у женщин, принимающих дезогестреловый препарат, чем гестоденсодержащие средства [4].

В совокупности имеющиеся данные *in vivo* и *in vitro* позволяют заключить, что гестоден представляет собой самый сильный из применяемых в настощее время гестогенов, который по своему фармакологическому профилю близок к природному гестагену прогестерону и поэтому по сравнению с дезогестрелом обладает выраженными преимуществами, которые заключаются в большей биодоступности гестодена и, следовательно, независимости от метаболической активности печени женщины, а также в близком с прогестероном характере биологической активности, что обусловливает его лучшую преносимость.

Объективный анализ результатов исследований последних лет (1996–1998) показал, что гестоденсодержащие препараты не только не увеличивают риск тромбоэмболических осложнений, но и защищает от развития серьёзных сердечно-сосудистых заболеваний, таких как инфаркт миокарда. Фемоден и Логест увеличивают уровень белков плазмы, связывающих половые стероиды и глюкокортикоиды, и снижают свободную концентрацию андрогенов в крови, что является причиной проявления лечебного эффекта у женщин с андрогензависимыми заболеваниями, такими как акне и гирсутизм [15].

Недавние исследования отечественных учёных подтвердили высокую антиандрогенную активность Логеста у женщин с гиперандрогиниями. При этом следует от-

метить, что между способностями гестоденсодержащего препарата Фемодена и дезогестрелсодержащего препарата Марвелона оказывать антиандрогенное действие, т. е. снижать частоту появления акне и себореи, статистически значимой разницы не обнаружено [18]. Нельзя не упомянуть также и другие аспекты положительного влияния гестоденсодержащих препаратов на организм. Оказалось, что длительное применение Логеста или Фемодена значительно снижает риск развития рака яичников и шейки матки и железодефицитной анемии, предохраняет от воспалительных заболеваний внутренних половых органов мочеполовой системы и уменьшает число случаев появления кист яичника, менорраги и практически сводит к нулю возможность возникновения внематочной беременности [19, 25].

Таким образом, выявление специфической активности прогестерона и его аналогов привело к разработке современных гестагенных препаратов, нашедших широкое применение для гормонозаместительной терапии и гормональной контрацепции, а также для лечения эндометриоза и гормонозависимых опухолей. Однако, несмотря на существование нескольких десятков различных гестагенов, всё ещё не разработаны адекватные критерии их выбора для каждой женщины в соответствии с индивидуальными особенностями функционирования её гестагенных рецептров, что требует дальнейших углублённых исследований всех этапов реализации биологической активности в клетках разных типов в норме и патологии. С нашей точки зрения, такие исследования будут способстововать более селективному и более селективному использованию всех гестагенных препаратов и, в особенности, гестагенчувствительных опухолей.

9.4.6. Концепция создания гормонального контрацептивного средства с оптимальной фармакодинамикой. Создание гормональных контрацептивных средств во второй половине прошлого века стало эпохальным событием в социальном развитии человечества, позволив наиболее приемлемым образом регулировать рождаемость. У женщины появилась свобода выбора оптимального времени рождения ребёнка, возможность гармонизировать семейные отношения, сохраняя репродуктивное здоровье.

Принцип действия КПК основан на способности женских половых гормонов — эстрогена и гестагена — подавлять овуляцию, увеличивать вязкость цервикальной слизи и уменьшать восприимчивость эндометрия к яйцеклетке, изменяя гормональный фон сходным с состоянием беременности образом, т. е. наиболее физиологическим способом. При поиске стероидных соединений с контрацептивным эффектом было обнаружено, что для его обеспечения мало пригодны эстрадиол и прогестерон, вырабатываемые в женском организме, так как при пероральном приёме они имеют низкую биодоступность и слишком быстрый период полувыведения. Однако благодаря успехам медицинской химии удалось решить эти проблемы, создав аналоги эндогенных гормонов с улучшенными фармакокинетическими свойствами. Прежде всего, это относится к открытию в 1938 г. этинилэстрадиола и этинилтестостерона (Этистерона) — первых пригодных для перорального приёма стероидов с эстрогенной и гестагенной активностью соответственно. С тех пор этинилэстрадиол остаётся практически единственным эстрогеном, входящим в состав всех комбинированных ГК (в редких случаях используют его предшественник местранол). В отличие от эндогенного эстрадиола, этинилэстрадиол обладает достаточно хорошей биодоступностью после перорального введения (около 40%) и повышенной устойчивостью к печёночному метаболизму. Если способность эстрадиола индуцировать синтез белков и липопротеинов в печени зависит от его пути введения, то гепатотропные эффекты этинилэстрадиола одинаковы как при пероральном, так и парентеральном введении.

В процессе развития гормональной контрацепции уточнялась доза этинилэстрадитола, и сейчас по содержанию этого компонента все КПК можно разделить на высокодозированные (50 мкг), среднедозированные (35–30 мкг) и низкодозированные (20–15 мкг). Высокодозированные препараты рекомендуют принимать лишь с лечебной целью, а выбор между средне- и низкодозированными ГК зависит от индивидуальных особенностей женщины и гестагенного компонента препарата.

Именно с совершенствованием гестагена и были связаны все наиболее значимые успехи гормональной контрацепции в последние десятилетия. В этой области важным достижением стал синтез гестагена второго поколения — норэтистерона, представляющего собой аналог 19-нортестерона. Преимущества норэтистерона по сравнению с этистероном заключались в его более высокой гестагенной активности и менее выраженном андрогенном действии. Затем появились другие производные нортестостерона: левоноргестрел, дезогестрел, гестоден, диеногест, а также производны прогестерона: ципротерона ацетат, хлормадинона ацетат и др. Параллельно с синтезом новых стероидов с гестагенной активностью началось изучение их дополнительных фармакологических свойств. Было установлено, что гестагенам, кроме их основного гестагенного действия, могут быть присущи дополнительные гормональные эффекты: андрогенные, антиандрогенные, эстрогенные, антиэстрогенные, глюкокортикоидные, антиглюкокортикоидные, минералокортикоидные или антиминералокортикоидные.

Было показано, что гестагенный компонент определяет суммарные метаболические и клинические эффекты комбинированных пероральных контрацептивов, играя решающую роль в различиях свойств отдельных препаратов. Поэтому сформировалась концепция, согласно которой желательно синтезировать такую молекулу стероида, которая бы по спектру своей фармакологической активности максимально приближалась к свойствам эндогенного прогестерона, отличаясь от него только приемлемой биодоступностью и устойчивостью к биодеградации при пероральном введении. При этом представлялось особенно важным учесть тот факт, что прогестерон является агонистом гестагенных рецепторов, но одновременно и антагонистом минералокортикоидных рецепторов, вызывая дестабилизирующий эффект в 12-й петле связывающего их домена.

Подавляя активность альдостерона, прогестерон оказывает выраженное регулирующее действие на обмен натрия и величину артериального давления. Особенно заметно это действие прогестерона при беременности, когда уровень ангиотензиногена становится очень высоким вследствие стимулирующего влияния эстрадиола на его синтез в печени. Можно полагать, что именно благодаря этому эффекту прогестерона у женщин до наступления менопаузы наблюдаются менее высокие значения артериального давления и у них меньший риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, чем у мужчин соответствующего возраста. Артериальное давление крыс самцов со спонтанной гипертензией сильно зависит от уровня NaCl, но до тех пор, пока у крыс самок функционируют яичники, такой зависимости нет. Эти данные, а также возможность снижения повышенного артериального давления, вызываемого эстрогенами, с помощью тиазидных диуретиков и спиронолактона, привлекла особое внимание к поиску синтетических гестагенов, которые бы по аналогии с эндогенным прогестероном могли бы влиять на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС). Составные части РААС — 11-β-гидроксилаза, альдостеронсинтаза и альдостероновые рецепторы присутствуют во всех участках сосудистого русла. Альдостерон, игибируя парасимпатическую систему, активируя симпатическую систему и вызывая провоспалительные и пролиферативные реакции, приводит к развитию патологических изменений в сосудах. Эти изменения, как показали исследования на экспериментальных моделях у животных и у больных людей, поддаются эффек-

тивному лечению с помощью антагониста альдостерона спиронолактона, а также прогестерона.

У людей экспрессия большого числа минералокортикоидных рецепторов выявлена в гиппокампе, височной и лобной долях головного мозга; она возрастает в период полового созревания и выражена сильнее у женщин, чем у мужчин. Согласно имеющимся данным минералокортикоидные рецепторы принимают участие в процессах адаптации на стрессовые воздействия, запоминания, обучения, в формировании настроения. Введение прогестерона сопровождается значительным увеличением экспрессии минералокортикоидных рецепторов в лимбической системе. Половой диморфизм экспрессии минералокортикоидных рецепторов после полового созревания указывает на его обусловленность действием прогестерона. Свободные минералокортикоидные рецепторы головного мозга имеют очень высокое сродство к циркулирующим глюкокортикоидам (кортизолу и кортикостерону) и сильно ими активируются, поскольку в головном мозге отсутствует метаболический барьер в виде 11-β-гидроксистероиддегидрогеназы. Так как концентрация глюкокортикоидов в крови обычно значительно превышает уровень альдостерона и других минералокортикоидов, полагают, что взаимодействие минералокортикоидных рецепторов головного мозга с глюкокортикоидами имеет важное физиологическое значение. Блокирование минералокортикоидных рецепторов головного мозга антиминералокортикодами (спиронолактоном), а также прогестероном может подавлять ингибирующее действие дексаметазона и эндогенных глюкокортикоидов на систему гипоталамус–гипофиз–надпочечники. Все эти данные подтверждали желательность создания синтетического гестагена с антиминералокортикоидной активностью, и усилия учёных увенчались успехом — среди аналогов спиронолактона было найдено такое соединение, названное дроспиреноном. Оно впервые было синтезировано при реализации программы поиска антагонистов альдостерона и затем было протестировано среди многих других соединений в 1978 г. ещё до открытия RU486 — антагониста гестагенных рецепторов, известного под названием мифепристон, на наличие антигестагенного эффекта при внутриматочном введении. Несмотря на то что у дроспиренона отсутствовала атигестагенная активность, в нём было обнаружено почти идеальное сочетание прогестагенных и антиминералокортикоидных свойств.

Дроспиренон одновременно комплементарен связывающим участкам человеческих рецепторов прогестерона и альдостерона. Из результатов, представленных в табл. 9.12, следует, что дроспиренон имеет умеренное сродство к гестагенным рецепторам, сравнимое с прогестероном и очень высокое сродство к минералокортикоидным рецепторам, которое выше по сравнению с прогестероном более чем в 2 раза. Впоследствии выявлено также высокое сродство дроспиренона к андрогенным рецепторам (табл. 9.12).

Исходя из представленных результатов, можно судить лишь о сродстве дроспиренона к тем или иным рецепторам, но они не показывают направления эффекта, которое может быть либо стимулирующим, либо ингибирующим. Были проведены все необходимые эксперименты, результаты которых доказывают наличие у дроспиренона прогестагенной активности (индукция трансформации эндометрия при внутриматочном введении кроликам, в тесте McPhail после подкожного введения кроликам, сохранение беременности у овариэктомированных крыс). Он также обладает антиовуляторной активностью у крыс после подкожного введения, что может быть следствием прямого гестагенного действия на яичник и может быть опосредовано ингибированием секреции гонадотропинов (по величине этой активности дроспиренон сходен с норэтистероном или ципротероном ацетатом). По величине антиминералокортикоидной активности, определяемой по диурезу у адреналэктомированных крыс, дроспиренон даже превосходит прогестерон и спиронолактон. Эффективная

Таблица 9.12

Относительное сродство дроспиренона в сравнении с другими гестагенами к рецепторам прогестерона и эстрадиола матки человека, рецепторам глюкокортикоидов, минералокортикоидов почек и андрогенов простаты крыс

Изучаемый стероид	Относительное сродство, %				
	Прогестероновый рецептор (^{3}H-R5020)	Глюкокортикоидный рецептор (^{3}H-дексаметазон)	Минералокортикоидный рецептор (^{3}H-альдостерон)	Андрогенный рецептор (^{3}H-R1881)	Эстрогенный рецептор (^{3}H-эстрадиол)
Прогестерон	30	12	100	< 0,1	< 0,1
3-Кетодезогестрел	180	10	< 0,1	20	< 0,1
Левоноргестрел	250	2,1	75	45	< 0,1
Дроспиренон	20	5	230	65	< 0,1

антиминералокортикоидная подкожная доза прогестерона, гестодена, спиронолактона и дроспиренона у адреналэктомированных крыс (в качестве заместительной терапии им вводили глюкокортикоид/альдостерон) составила 2, 4, 1, и менее 1 (0,25 перорально) мг/животное соответственно. Даже в высоких дозах (более 8 мг/животное) ципротерона ацетат, норэтистерон, 3-кето-дезогестрел и левоноргестрел в этом отношении были не активны. Весьма благоприятным оказалось наличие у дроспиренона антиандрогенной активности (дроспиренон подавляет действие эндогенных и экзогенных андрогенов на различных экспериментальных моделях у крыс, в том числе в тесте Herschbergerer).

В качестве подтверждения антиминералокортикоидного действия дроспиренона были получены данные о его способности, так же как и спиронолактона и прогестерона, снижать систолическое и диастолическое артериальное давление у крыс самцов линии Вистар со спонтанной гипертензией. Этот эффект сопровождался уменьшением уровня натрия в плазме крови. В то же время такие гестагены, как левоноргестрел и ципротерона ацетат, в этом отношении были не активны. Подкожное введение крысам дроспиренона (3 мг/день) с 10 по 20 день беременности частично предотвращало начальное повышение артериального давления, вызываемое NG-нитро-L-аргининметиловым эфиром (50 мг/день, подкожно), а затем его полностью нормализовывало.

Приведённые данные доклинических исследований дроспиренона полностью подтвердились при проведении его испытаний у людей. Исследование различных комбинаций дроспиренон/этинилэстрадиол показало, что надёжное подавление функции яичников наблюдается при дозах 3,0 мг/30 мкг соответственно. Именно такое сочетание дроспиренона и этинилэстрадиола имеет место в новом гормональном контрацептивном препарате Ярина. При проведении клинических испытаний этого препарата принималось во внимание, что он, как и все комбинированные пероральные контрацептивы, должен не только надёжно предохранять от нежелательной беременности, но и хорошо переноситься, вызывать как можно меньше побочных эффектов и неудобств.

Клинический опыт показывает, что большинство женщин, которые не удовлетворены пероральными контрацептивами, отказываются от этих препаратов, прежде

всего из-за межменструальных кровотечений и увеличения массы тела. Определённый вклад в общую частоту отказа от приёма этих препаратов могут вносить такие побочные эффекты, как тошнота, нагрубание молочных желёз, изменение настроения, обострение кожных заболеваний и головные боли. Установлено, что препарат Ярина эффективно подавляет овуляцию и обеспечивает дополнительную контрацептивную защиту благодаря снижению восприимчивости эндометрия к имплантации оплодотворённой яйцеклетки.

Согласно полученным результатам установлено, что препарат Ярина является высокоэффективным средством контрацепции для молодых здоровых женщин, нуждающихся в предохранении от нежелательной беременности (табл. 9.13).

Таблица 9.13

Контрацептивная эффективность препарата Ярина в сравнении с комбинацией этинилэстрадиола (ЭЭ, 30 мкг) и дезогестрела (ДЗГ, 150 мкг)

Авторы	Испытуемые препараты (число женщин)	Число беременностей (% беременностей)	Индекс Перла[а] (число циклов)	Скорректированный индекс Перла[б] (число циклов)
Foidart и др.	Ярина (442)	3 (0,7)	0,41 (9563)	0,0 (9490)
	Комбинированный пероральный контрацептив: 30 мкг ЭЭ + 150 мкг ДЗГ (445)	3 (0,7)	0,41 (9498)	0,0 (9422)
Huber и др.	Ярина (1657)	10 (0,6)[в]	0,7 (18699)	0.07 (18418)
	Комбинированный пероральный контрацептив: 30 мкг ЭЭ + 150 мкг ДЗГ (412)	1 (0,2)	0,28 (4719)	0,28 (4865)
Parsey и Pong	Ярина (326)	1 (0,3)	0,41 (3201)	0,0 (3192)

[а] Индекс Перла — общее число незапланированных беременностей на 100 женщин, использовавших данный метод контрацепции в течение 1 года (рассчитывают путём умножения числа беременностей на 1300 и деления на число циклов, во время которых было принято 19 таблеток и более). [б] Скорректированный индекс Перла получен путём исключения всех случаев беременностей, которые объясняются другими факторами, а не ошибкой метода (например, ошибкой пользователя — несоблюдением режима приёма контрацептивных таблеток). [в] Ошибкой метода (неудачей метода контрацепции) была объяснена только одна беременность.

Из представленных результатов двух рандомизированных сравнительных исследований видно, что контрацептивная эффективность препарата Ярина сходна с эффективностью комбинированного перорального контрацептива, который содержал 30 мкг этинилэстрадиола и 150 мкг дезогестрела. При этом препарат Ярина обеспечил прекрасный контроль менструального цикла, редко вызывая межменструальные кровотечения и аменорею, и в этом отношении также был сходен с другими комбинированными пероральными контрацептивами, содержащими 30 мкг этинилэстрадиола.

При изучении клинических проявлений антиминералокортикоидного действия дроспиренона у здоровых женщин проводили регулярные измерения артериального давления и массы тела. Дроспиренон в дозах до 3 мг в комбинации с 15, 20 или

30 мкг этинилэстрадиола не вызывал клинически значимых изменений артериального давления. У женщин, принимавших препарат Ярина и другие препараты, содержащие дроспиренон, наблюдалось некоторое снижение массы тела вследствие уменьшения задержки воды. У женщин, которые принимали другие комбинированные пероральные контрацептивы, содержащие 30 мкг этинилэстрадиола, была отмечена тенденция к увеличению массы тела, обусловленная задержкой воды.

У женщин, которые принимали комбинации 15–30 мкг этинилэстрадиола и 3 мг дроспиренона ($n = 60$) или 30 мкг этинилэстрадиола/150 мкг левоноргестрела ($n = 20$), не отмечалось значимых изменений концентраций натрия, креатинина и калия в сыворотке [26]. Тем не менее, вследствие антиминералокортикоидной активности дроспиренона (3 мг дроспиренона сходны по этой активности с 25 мг спиронолактона) существует вероятность развития гиперкалиемии у женщин высокого риска (особенно у пациенток с нарушениями функции почек), которые принимают пероральный контрацептив, содержащий дроспиренон, а также в тех случаях, когда комбинации этинилэстрадиол/дроспиренон применяют одновременно с калийсберегающими диуретиками. Женщинам с заболеваниями, которые предрасполагают к гиперкалиемии (например, почечная недостаточность, нарушение функции печени и недостаточность надпочечников) следует учитывать такое действие препарат Ярина.

Другое важное клиническое преимущество препарата Ярина относится к его способности снижать выраженность предменструального синдрома (ПМС) — циклически возникающих психологических, поведенческих и физических симптомов, включая нагрубание молочных желёз и других проявлений, связанных с задержкой в организме воды, которые начинаются после овуляции и прекращаются через несколько дней после начала менструации. Благодаря уникальным антиминералокортикоидным свойствам дроспиренона, препарат Ярина, по сравнению с другими пероральными контрацептивами, может оказывать более выраженное благоприятное действие на проявления ПМС. Доказано, что приём препарата Ярина уменьшает число симптомов, связанных с менструацией. В этом исследовании 322 женщины заполняли состоящий из 23 пунктов вопросник, в котором симптомы оценивали по 5-балльной шкале, от 0 (отсутствие симптома) до 4 (тяжёлый симптом) в начале исследования и в конце 6-го цикла. Было отмечено достоверное уменьшение, относительно исходных значений, негативных эмоций ($p < 0{,}001$) и симптомов, связанных с задержкой воды ($p \leqslant 0{,}001$) во время предменструальной и менструальной фаз. Облегчение симптомов было достоверным как у женщин, которые впервые принимали препарат Ярина, так и у женщин, которые стали принимать его вместо других комбинированных пероральных контрацептивов. Кроме того, в предменструальной и менструальной фазах 6-го цикла наблюдалось достоверное снижение повышенного аппетита по сравнению с исходным ($p < 0{,}001$).

Клинически значимое положительное влияние на общее психологическое благополучие было отмечено во время 3-го цикла и сохранялось на протяжении всего исследования. Помимо этого, во время приёма препарата Ярина наблюдалось достоверное снижение частоты и тяжести соматических симптомов, связанных с менструальным циклом (боли в низу живота и нагрубание молочных желез). По оценке исследователей, препарат Ярина улучшил самочувствие 80% женщин, и это согласуется с числом женщин (75%), которые были удовлетворены результатами приёма препарата Ярина.

В двух сравнительных клинических испытаниях препарата Ярина и комбинированного перорального контрацептива, содержащего 30 мкг этинилэстрадиола и 150 мкг дезогестрела, оценивали влияние препарата Ярина на массу тела, кожные проявления, предменструальные симптомы, общее самочувствие и ощущение благополучия. Женщины, принимавшие препарат Ярина (180 респонденток), сообщили,

что они чувствуют себя гораздо лучше, чем в период без него. Это касалось общего самочувствия до и во время менструации, а также изменения массы тела, состояния кожи и волос. По мнению самих женщин препарат Ярина положительно влияет на физическое и психическое благополучие.

В проспективном исследовании сравнивали эффекты обычного 21-дневного приёма препарата Ярина (всего 1221 женщина) с эффектами длительного приёма этого препарата (63–126 дней непрерывного использования; 175 женщин). После 6 месяцев применения препарата по обычной и непрерывной схеме наблюдалось снижение, относительно исходного значения, числа женщин с предменструальными симптомами, такими как нагрубание молочных желёз, боли в низу живота и отёки. Вместе с тем, в группе, принимавшей препарат Ярина по непрерывной схеме, улучшение самочувствия наблюдалось у большего числа женщин (85%), чем в группе, которая принимала препарат по обычной схеме (66%). Тенденция к более выраженному положительному влиянию на самочувствие у женщин, принимавших препарат по непрерывной схеме, согласуется с тем фактом, что в этой группе больше пациенток были готовы рекомендовать другим женщинам такую схему, чем в группе, которая принимала препарат по обычной схеме.

В целом, результаты свидетельствуют о том, что препарат Ярина оказывает полезное действие при лечении ПМС, в том числе с дисфорией, причём устойчивая тенденция к облегчению предменструальных симптомов наблюдается в разных клинических исследованиях и в повседневной клинической практике. Следует подчеркнуть также, что благоприятное влияние препарата Ярина на самочувствие женщин может положительно сказаться на соблюдении ими режима терапии и на их отношении к препарату.

Эти положительные свойства препарата Ярина подчёркивают его уникальность по сравнению с ранее существовавшими гормональными контрацептивами. Однако помимо указанных свойств препарат Ярина обладает ещё и антиандрогенной активностью, уменьшая проявления угревой сыпи и себореи.

Исследования показали, что благодаря антиандрогенным свойствам дроспиренона препарат Ярина положительно влияет на угревую сыпь лёгкой и средней степени тяжести у молодых женщин. Подтверждением антиандрогеного действия служат данные о снижении концентрации свободного (не связанного) тестостерона и повышении уровня глобулинов, связывающих половые стероиды. У женщин, леченных препаратом Ярина, концентрация общего тестостерона снизилась на 28%, а у женщин, которые принимали комбинированный пероральный контрацептив, содержащий 30 мкг этинилэстрадиола и 2 мг ципротерона ацетата, — на 15%; оба препарата снизили уровень андростендиона примерно на 25%.

Приём препарата Ярина сопровождается улучшением состояния кожи у женщин с угревой сыпью и себорей. Рандомизированное двойное слепое исследование, в котором участвовали 82 женщины с угревой сыпью лёгкой или средней степени тяжести, показало, что препарат Ярина и комбинированный пероральный контрацептив, содержащий 30 мкг этинилэстрадиола и 2 мг ципротерона ацетата, достоверно снизили среднее число невоспалительных кожных элементов после 9 месяцев лечения. Помимо этого, оба препарата достоверно уменьшили выработку кожного сала и рост волос на верхней губе и подбородке. Субъективная оценка влияния этой терапии на угревую сыпь на лице дерматологами, гинекологами и самими женщинами свидетельствует о прекрасном или хорошем эффекте в обеих группах.

В другом рандомизированном двойном слепом исследовании длительностью 6 циклов у женщин с папуло-пустулезной угревой сыпью препарат Ярина сравнивали с трёхфазным комбинированным пероральным контрацептивом, содержащим 35 мкг этинилэстрадиола и 180/215/250 мкг норгестимата. Анализ эффективности прово-

дился в группах из 530 и 543 женщин соответственно. Оценка влияния лечения на угревую сыпь на лице исследователями и самими женщинами свидетельствует о более выраженном улучшении у пациенток, принимавших препарат Ярина, чем у пациенток, которые принимали трёхфазный контрацептив.

Таким образом, фундаментальные исследования механизмов действия гестагенов и зависимости их фармакологической активности от химической структуры позволили разработать концепцию создания гормонального контрацептива с оптимальной фармакодинамикой. Суть этой концепции заключается в создании гестагена, максимально приближённого по своей фармакодинамике с эндогенным яичниковым гормоном прогестероном. Практической реализацией данной концепции стал гестаген дроспиренон, входящий в состав препарата Ярина — высокоэффективного контрацептива, идеального для женщин, желающих иметь надёжную контрацепцию и испытывающих предменструальный синдром, в том числе сопровождаемый дисфорией. Дроспиренон — уникальный гестаген, единственный среди прогестинов, являющийся производным спиронолактона. В его молекуле в терапевтической дозе сочетаются прогестагенная, антиминералокортикоидная и антиандрогенная активности. Создание дроспиренона стало инновационным достижением, существенно улучшающим гормональную контрацепцию.

В дозе 3 мг, содержащейся в препарате Ярина, дроспиренон обладает антиминералокортикоидной активностью, сходной с активностью 20–25 мг спиронолактона. Благодаря этому дроспиренон противодействует задержке натрия и воды, не позволяя развиться таким эстрогенозависимым побочным эффектам, как увеличение массы тела и нагрубание молочных желёз, которые часто наблюдаются при приёме других контрацептивных препаратов. Необходимо подчеркнуть, что вызываемая дроспиреноном потеря натрия не сопровождается клинически значимым повышением концентрации калия. Ярина обеспечивает прекрасный контроль менструального цикла, редко вызывая межменструальные кровотечения и аменорею.

Препарат Ярина — это хорошо переносимый контрацептив. Большинство побочных эффектов этого препарата являются лёгкими и преходящими и не требуют его отмены. Кроме того, препарат Ярина не оказывает клинически значимого влияния на артериальное давление и углеводный метаболизм. Он эффективно препятствует увеличению массы тела, связанному с задержкой воды. Применяя Ярину, женщина может быть уверенной не только в надёжной контрацепции, но и получить целый спектр дополнительных благоприятных эффектов в отношении повышения качества жизни, благодаря уменьшению тяжести предменструальных симптомов, проявлений акне и себореи, а также положительного влияния на общее самочувствие.

9.5. Новый отечественный гестаген с противоопухолевой активностью

Препараты стероидной природы с гестагенной активностью в последние годы всё шире применяются в медицинской практике. Такая тенденция связана с тем, что гестагены необходимы не только для гормонозаместительной терапии и гормональной контрацепции, но и в борьбе с опухолевыми заболеваниями, что связано с их способностью оказывать антипролиферативное действие. В частности, уже ряд гестагенных препаратов (медроксипрогестерона ацетат, гестенорона капроат) имеют такое утверждённое показание, как рак молочной железы, рак тела матки, эндометрия, предстательной железы («Федеральное руководство по использованию лекарственных средств для врачей». Вып. VI. 2005. С. 786). Указанные в этих препаратах гестагены содержат Δ^4-3-кето-группировку, характерную не только для прогестерона, но и для

тестостерона. Последнее может быть причиной наличия у этих гестагенов побочных андрогенных свойств, вызывающих верилизацию у женщин, увеличение массы тела. Поиск новых соединений, обладающих избирательной гестагенной активностью, вызывающих меньшее число побочных эффектов по сравнению с существующими препаратами и обладающих противоопухолевой активностью, является актуальной задачей современной медицины. В настоящее время в ЦХЛС-ВНИХФИ синтезировано новое соединение 17-α-ацетокси-3-β-бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (АБМП), не содержащее Δ^4-3-кето-группировки, по структуре сходное с прогестероном, но в отличие от него способное хорошо всасываться при пероральном приёме. В связи с этим нами изучена специфическая фармакологическая активность АБМП, в том числе противоопухолевое действие, и также оценена его токсичность.

9.5.1. Исследование гестагенной активности АБМП. Исследование гестагенной активности проводилось согласно тесту Clauberg–McPhail [9]. В тесте использовались инфантильные кролики, самки с массой 600–800 г. После овариэктомии кролики случайным образом были разделены на группы в соответствии с получаемыми препаратами. Спустя 7 дней всем животным вводили в течение 6 дней β-эстрадиол в дозе 5 мг/животное внутримышечно. Затем в течение 5 дней животные в соответствующих группах получали АБМП перорально в дозах 0,008–0,4 мг/кг/день, и гестагены сравнения — Ацетомепрегенол (Россия) перорально в дозах 0,008–0,4 мг/кг/день, Левоноргестрел (Германия) перорально в дозах 0,008–0,4 мг/кг/день перорально и Прогестерон (Sigma) в дозах 0,0125–4 мг/кг/день внутримышечно. На следующий день после последнего введения препаратов животных забивали и извлекали матку, которую затем исследовали гистологически (табл. 9.14).

Таблица 9.14

Гестагенная активность изучаемых препаратов у самок кроликов, определяемая по величине ED_{50} (дозы, при которой происходит трансформация эндометрия на 50%)

Препарат	Способ введения	Количество животных	Интервал, доз мг/кг	ED_{50}, мг/кг	Относительная активность (прогестерон = 1)
Прогестерон	Внутримышечно	50	0,0125–4	0,26	1
Левоноргестрел	Перорально	30	0,008–0,4	0,05	5,2
Ацетомепрегенол (АМП)	Перорально	20	0,008–0,4	0,01	26
АБПМ	Перорально	25	0,008–0,4	0,0025	102,93

Из представленных результатов следует, что АБМП проявляет высокую способность переводить эндометрий кроликов из пролиферативной фазы в фазу секреции, что является показателем гестагенной активности данного соединения. Показано, что АБМП превосходит гестагенную активность ацетомепрегенола в 3,9 раз, а левоноргестрела в 19,7 раз. По сравнению с прогестероном, АБМП активней более чем в 102,9 раз, несмотря на то что прогестерон вводили внутримышечно, а АБМП перорально.

Таким образом, у кроликов АБМП обладает более выраженной гестагенной активностью в отношении ткани эндометриия, чем препараты сравнения.

9.5.2. Исследование влияния АБМП на эндометрий крыс. Исследования проводились на половозрелых белых крысах, самках, со средней массой 190 г, содержавшихся на стандартной лабораторной диете. Крысы были разделены слу-

чайным образом на 4 группы по 5 животных. Первая группа получала АБМП в дозе 0,01 мг/кг, вторая группа получала АБМП в дозе 0,025 мг/кг, третья группа получала левоноргестрел в дозе 0,01 мг/кг, четвёртая, контрольная, группа получала растительное масло. Во всех группах животные получали соединения перорально в течение 6 сут. Затем животных забивали декапитацией и выделяли комплекс матка–яичники. Органы помещали в 1%-й глутаровый альдегид и готовили микропрепараты с использованием микротома. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и микроскопировали при увеличении × 90. Наличие гестагенной активности определяли по способности препаратов переводить эндометрий в фазу секреции. Подсчёт количества митозов производили в каждом случае в 30 полях зрения в каждом образце при увеличении × 1000. Результаты обрабатывали по критерию Уилкоксона (табл. 9.15).

Таблица 9.15

Влияние изучаемых соединений на число митозов в эндометрии крыс

Соединение	Число митозов
АБМП 0,01 мг/кг/день в течение 6 дней	$2{,}6 \pm 1{,}6$ *
АБМП 0,025 мг/кг/день в течение 6 дней	$1{,}6 \pm 1{,}1$ *
Левоноргестрел 0,01 мг/кг/день в течение 6 дней	$2{,}4 \pm 1{,}1$ *
Контроль (растительное масло)	$8{,}4 \pm 3{,}5$

* Достоверное отличие от контроля при $p = 0{,}01$.

У животных первой группы, получавших АБМП в дозе 0,01 мг/кг/день в течение 6 дней, гистологически наблюдали фазу пролиферации эндометрия — довольно плотную строму, практическое отсутствие сосудов; мало желёз маленького размера округлой формы; эпителий желёз с высокими ядрами, расположенными на разном уровне, плотной гомогенной эозинофильной цитоплазмой с субнуклеарными вакуолями (встречаются железы, в просвете которых определяются эритроциты, слизь, лейкоциты). Картина отличается от контрольной группы, где преобладает пролиферативная фаза.

У животных второй группы (рис. 9.4, цветная вклейка), получавших АБМП в дозе 0,025 мг/кг/день в течение 6 дней, гистологически наблюдали во всех случаях фазу секреции (с преобладанием картины ранней секреции за исключением 2 случаев, где признаки секреции более явные). Эндометрий находился в фазе секреции — строма более светлая, рыхлая, с признаками псевдодецидуальной трансформации клеток, особенно в функциональном слое. Наблюдали появление сосудов в виде мелких скоплений («клубков»), увеличение числа желёз, их извитость. Отмечено наличие светлой цитоплазмы эпителия желёз и появление вакуолизации, ядра клеток более бледные, округлые, упорядоченно расположены базально, на одном уровне. Полученные результаты в данной группе свидетельствуют о выраженной гестагенной активности в данной дозе у нового соединения.

У животных третьей группы, получавших левоноргестрел в дозе 0,01 мг/кг/день в течение 6 дней, гистологически наблюдали во всех случаях фазу секреции, причём картина секреции более выражена, чем во 2-й группе. Эндометрий находился в фазе секреции — строма светлая, рыхлая, с признаками псевдодецидуоденальной трансформации клеток, особенно в функциональном слое. Наблюдали появление сосудов в виде мелких скоплений («клубков»), увеличение числа и размеров желёз, извитую форму желёз. Цитоплазма эпителия желёз была светлая, со значительным

количеством довольно крупных вакуолей, ядра клеток были более бледные, округлые, крупные, упорядоченно расположены базально, на одном уровне. Полученные результаты в данной группе свидетельствуют о выраженной гестагенной активности в данной дозе у левоноргестрела.

У животных четвёртой контрольной группы (рис. 9.5, цветная вклейка), получавшей растительное масло в течение 6 дней, гистологически наблюдали фазу пролиферации. Строма эндометрия была довольно плотной. Сосуды практически не определялись; желёз мало, мелкие, округлой формы; эпителий желёз с высокими ядрами, расположенными на разном уровне, плотной гомогенной эозинофильной цитоплазмой без вакуолизации, появляются мелкие субнуклеарные вакуоли. Полученные результаты в данной группе характерны для отсутствия гестагенной активности.

Для оценки влияния соединений на пролиферативную активность проводили подсчёт числа митозов в образцах эндометрия. Количество митозов в эндометрии животных, получавших левоноргестрел и АБМП, достоверно ниже по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о наличии гестагенной активности у АБМП и подтверждает результаты микроскопических исследований, описанных выше. Статистически достоверной разницы между одинаковыми дозами АБМП и левоноргестрела при подсчёте числа митозов не выявлено.

Таким образом, полученные в эксперименте на крысах данные и результаты теста Clauberg–McPhail позволяют говорить о присутствии гестагенной активности у АБМП в отношении эндометрия крыс, которая по своей величине не отличается от гестагенной активности известного гестагена левоноргестрела. Отличие результатов по относительной активности изучаемых гестагенов у кроликов и крыс, возможно, связано с видовыми различиями.

9.5.3. Исследование андрогенной и анаболической активности АБМП. Исследование проводили по методике Киршенблата на инфантильных кастрированных самцах крыс. Крысы были разделены случайным образом на 3 группы. В течение 7 дней животным вводили внутримышечно АБМП (1,5 мг/кг/день), тестостерона пропионат (1,5 мг/кг/день). Контрольная группа получала растительное масло. Затем животных забивали декапитацией и выделяли *m. levator ani*, семенные пузырьки, вентральную простату. Для изучения анаболического эффекта определяли массу *m. levator ani*, для изучения андрогенного эффекта определяли массу семенных пузырьков и вентральной простаты.

У животных, получавших АБМП, масса семенных пузырьков и вентральной простаты составила $10{,}8 \pm 1{,}7$ и $20{,}3 \pm 2{,}8$ мг/100 г массы тела соответственно. У животных контрольной группы, получавших растворитель, масса соответствующих органов составила $10{,}1 \pm 0{,}6$ и $16{,}9 \pm 4{,}7$ мг/100 г массы тела. Таким образом, показано, что введение АБМП в дозе 1,5 мг/кг не вызывает статистически достоверного увеличения массы семенных пузырьков и вентральной простаты по сравнению с контрольной группой. Полученные данные указывают на отсутствие у АБМП андрогенного эффекта.

При исследовании массы *m. levator ani* у животных, получавших АБМП, показано, что масса этой мышцы составляла $63{,}0 \pm 7{,}5$ мг/100 г массы тела. В контрольной группе, получавшей растворитель, масса *m. levator ani* составляла $67{,}7 \pm 13{,}3$ мг/100 г массы тела. Таким образом, показано, что введение АБМП в дозе 1,5 мг/кг не вызывает статистически достоверного увеличения массы *m. levator ani* по сравнению с контрольной группой. Это позволяет сделать вывод об отсутствии анаболического эффекта у АБМП

Для сравнения в эксперименте имелась группа крыс, получавших тестостерона пропионат. В этой группе масса семенных пузырьков и вентральной простаты

составила $18{,}2 \pm 1{,}1$ и $77{,}4 \pm 2{,}3$ мг/100 г, что отражает выраженную андрогенную активность препарата. Масса *m. levator ani* у животных этой же группы составила $102{,}1 \pm 3{,}1$ мг/100 г. Исходя из представленных данных можно утверждать об отсутствии андрогенных и анаболических эффектов у нового соединения (табл. 9.16).

Таблица 9.16

Влияние АБМП и тестостерона пропионата на массу семенных пузырьков, вентральную простату и *m. levstor ani* у орхидэктомированных крыс самцов

Препарат	Масса		
	семенных пузырьков, мг/100 г массы тела	вентральной простаты, мг/100 г массы тела	*m. levator ani*, мг/100 г массы тела
Тестостерона пропионат (1,5 мг/кг/день в течение 7 дней)	$18{,}2 \pm 1{,}1$ **	$77{,}4 \pm 2{,}3$ **	$102{,}1 \pm 3{,}1$ **
Контроль (оливковое масло)	$10{,}1 \pm 0{,}6$	$16{,}9 \pm 4{,}7$	$67{,}7 \pm 13{,}3$
АБМП (1,5 мг/кг/день в течение 7 дней)	$10{,}8 \pm 1{,}7$ *	$20{,}3 \pm 2.8$ *	$63{,}0 \pm 7{,}5$ *

* Достоверное отличие от группы тестостерона пропиноата при $p \leqslant 0{,}05$; ** достоверное отличие от контроля при $p \leqslant 0{,}05$.

9.5.4. Исследование влияния АБМП на уровень прогестерона в крови у крыс. Из литературных источников известно, что синтетические гестагены способны оказывать влияние на уровень прогестерона благодаря действию ось гипоталмус–гипофиз–яичники [11]. Поэтому было проведено исследование по влиянию АБМП и препаратов сравнения на уровень прогестерона при 8-ми суточном пероральном введении в различных дозах, результаты которого представлены на рис. 9.6. АБМП вводили животным в разных дозах, что обусловлено способностью соединений данного класса вызывать контрацептивный эффект в дозе 0,01 мг/кг и противоопухолевый эффект в дозе 0,025 мг/кг.

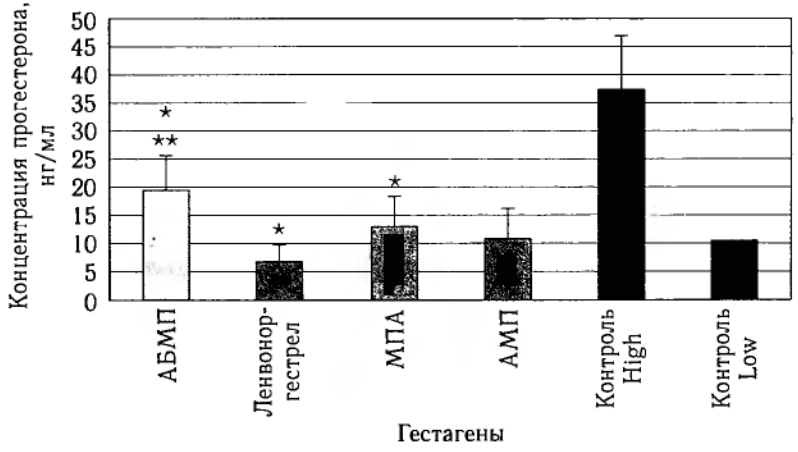


Рис. 9.6. Влияние гестагенов на уровень прогестерона в крови самок крыс при 8-ми суточном введении препаратов в дозе 0,025 мг/кг

Исследования проводились на половозрелых белых крысах, самках, со средней массой 180–200 г, содержавшихся на стандартной лабораторной диете. Крысы были разделены случайным образом на 7 групп по 6–10 животных. Группы животных получали перорально суспензию соединений в растительном масле: АБМП (0,01 мг/кг/день, 0,025 мг/кг/день), левоноргестрел (0,01 мг/кг/день, 0,025 мг/кг/день), МПА (0,025 мг/кг/день), АМП (0,025 мг/кг/день) в течение 8 дней. Животных забивали декапитацией под лёгким эфирным наркозом. Измерение концентрации прогестерона в сыворотке крови крыс проводили с использованием наборов для иммуноферментного анализа (DSLabs, США). Результаты статистически обрабатывали с использованием Т-критерия Стьюдента.

Так как животные в контрольной группе находились в разной фазе гормонального цикла, то уровень прогестерона в крови, между разными животными одной группы, существенно различался. Исходя из этого контрольная группа была разделена на две группы: животные, находящиеся в фазе с высоким содержанием прогестерона в крови (High) и с низким содержанием прогестерона (Low) в сыворотке. Показано, что новое соединение достоверно снижает концентрацию прогестерона в крови у экспериментальных животных, до 51,8% (по отношению к контролю с высоким содержанием прогестерона). Влияние АБМП на уровень прогестерона было достоверно ниже, чем у левоноргестрела (18,3%). Выявлено наличие тенденции к менее выраженному влиянию АБМП (51,8%) на уровень прогестерона по сравнению с МПА (34,8%) и АМП (29,2%). В отличие от препаратов сравнения, которые снижали уровень прогестерона до уровня контроля Low, АБМП уменьшал концентрацию прогестерона в крови до среднего значения между контролем High и Low, которое достоверно отличается от контроля High и Low.

При исследовании влияния АБМП и левоноргестрела на уровень прогестерона, результаты которого представлены на рис. 9.6, показано, что при дозе АБМП 0,01 мг/кг и 0,025 мг/кг уровень прогестерона в крови достоверно отличался от контроля High и Low. Показано, что оба соединения достоверно снижают концентрацию прогестерона в крови, причём влияние АБМП на уровень прогестерона менее выражено по сравнению с левоноргестрелом.

Из представленных данных следует, что АБМП достоверно снижает уровень прогестерона у крыс, находящихся в фазе с высоким содержанием прогестерона в крови при 8-ми суточном пероральном введении, как в дозах вызывающих контрацептивный эффект, так и в дозах, вызывающих противоопухолевое действие. Следует отметить, что АБМП приводит уровень прогестерона до среднего значения достоверно отличающегося от контроля High и Low, в отличие от препаратов сравнения, которые доводят уровень прогестерона до значения контроля Low (рис. 9.7).

По итогам исследования специфической гестагенной активности АБМП можно сделать следующие выводы.

1. АБМП в тесте Clauberg–McPhail у кроликов показал высокую гестагенную активность, превосходящую все препараты сравнения (прогестерон, левоноргестрел, АМП). По величине гестагенной активности соединения расположились следующим образом: АБМП > ацетомепрегенол > левоноргестрел > прогестерон.

2. АБМП оказывает гестагенное действие на морфологию эндометрия крыс, выражающееся в преходе пролиферативной фазы в секреторную.

3. АБМП в экспериментах на крысах устанавливает уровень прогестерона в крови до среднего значения находящегося между контролем High и Low. Препараты сравнения (левоноргестрел, АМП, медроксипрогестерона ацетат (МПА)) снижали уровень прогестерона до значения, соответствующего контролю Low, что свидетельствует о том, что АБМП обладает менее выраженными центральными эффектами,

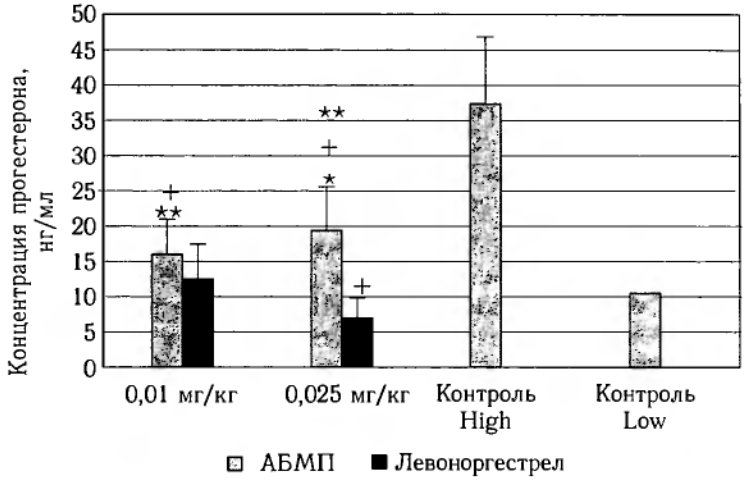


Рис. 9.7. Влияние АБМП и левоноргестрела на концентрацию прогестерона в крови крыс при 8-суточном введении препаратов в дозе 0,01 и 0,025 мг/кг

но более сильным периферическим гестагенным действием по сравнению с МПА и прогестероном.

4. Показано отсутствие у АБМП анаболических и андрогенных эффектов.

9.5.5. Цитостатическая и противоопухолевая активность АБМП. Для изучения цитостатической и противоопухолевой активности АБМП в качестве объектов исследования выбраны клеточные культуры рака молочной железы (РМЖ) человека и рака шейки матки (РШМ) человека, а также перевиваемая опухоль мыши РШМ-5.

В наших исследованиях показано, что новый гестаген АБМП обладает цитостатической активностью в отношении не только клеток РМЖ MCF-7, но и клеток рака шейки матки человека (линия HeLa). Изучение противоопухолевой активности АБМП *in vivo* проводили на перевиваемом раке шейки матки РШМ-5, чувствительном к прогестинам при ортотопической перевивке. Было показано, что АБМП в дозе 1 мг/мышь тормозит рост опухоли РШМ-5 на 73%, тогда как препарат МПА в той же дозе — на 55%. Таким образом, АБМП при пероральном применении обладает противоопухолевой активностью в отношении РШМ-5, причём по терапевтическому эффекту превосходит препарат сравнения МПА.

9.5.6. Изучение механизмов цитостатической активности АБМП. Анализ специфических участков связывания ^3H–P_4 в культурах клеток проводили с целью выявления высокоаффинных мест связывания (рецепторов) прогестерона, через которые, возможно, осуществляется цитотоксический эффект АБМП.

Нами показано, что клетки MCF-7 и HeLa содержат рецепторы прогестерона, сходные между собой по константе ассоциации с прогестероном (K_a = $= 1{,}29 \cdot 10^9$ моль$^{-1}$ и $0{,}78 \cdot 10^9$ моль$^{-1}$ соответственно).

При анализе относительной связывающей способности (RBA) АБМП и МПА со специфическими участками связывания прогестерона было показано, что АБМП и МПА связываются с рецепторами прогестерона с большим сродством, чем прогестерон. АБМП и МПА превосходят прогестерон по RBA в 17 и 5 раз соответственно. Таким образом, АБМП имеет большее сродство к рецепторам прогестерона, чем препарат сравнения МПА.

Анализ процессов апоптоза в культуре клеток проводили с целью выявления проапоптотического эффекта как одного из возможных механизмов цитотоксического

действия АБМП. Для выявления наличия и степени выраженности апоптоза в культуре проводили оценку наличия и степени выраженности специфической деградации клеток ДНК исследуемой культуры. Предложенный метод является совокупностью стандартных молекулярно-биологических методов анализа ДНК.

Схема эксперимента. Клетки MCF-7 инкубировали в течение 7 сут в присутствии АБМП, прогестерона и в отсутствии соединений (контроль). По истечении указанного срока инкубации проводили оценку специфической деградации ДНК (табл. 9.17).

Таблица 9.17

Деградация ДНК в клетках при инкубации с АБМП и прогестероном в течение 7 сут

Концентрация исследуемых соединений, моль/л	АБМП	Прогестерон	Контроль
$1 \cdot 10^{-6}$	$0{,}20 \pm 0{,}02$	$0{,}20 \pm 0{,}02$	—
$1 \cdot 10^{-7}$	$0{,}22 \pm 0{,}03$	$0{,}22 \pm 0{,}03$	—
$1 \cdot 10^{-8}$	$0{,}24 \pm 0{,}03$	$0{,}22 \pm 0{,}02$	—
—	—	—	$0{,}22 \pm 0{,}03$

Значения в клетках таблицы — степень деградации ДНК, выраженная в условных единицах от 0,00 (отсутствие деградации) до 1,00 (абсолютная деградация геномной ДНК клеток).

Таким образом, нами показано, что в клетках MCF-7 цитотоксический эффект АБМП и прогестерона опосредован через механизмы, не связанные с индукцией апоптоза.

9.5.7. Негеномные эффекты гестагенов. АБМП как химиосенсибилизатор. Не все биологические эффекты гестагенов опосредованы цитозольными рецепторами прогестерона (РП) как транскрипционным фактором. К быстрым, негеномным эффектам прогестерона относятся индукция созревания овоцитов, стимуляция акросомной реакции в сперме, модуляция возбудимости нервных клеток и волокон, активация сигнального пути Src/Ras/MAPK (семейство mitogenactivated protein kinases) в клетках РМЖ. С активацией сигнального пути Src/Ras/MAPK в клетках РМЖ связывают влияние гестагенов на пролиферацию раковых клеток. Была обнаружена выраженная корреляция между антипролиферативной активностью гестагенов и их способностью повышать концентрацию внутриклеточных нуклеотидов цГМФ и цАМФ за счёт ингибирования их экспорта из раковых клеток. Нуклеотиды цГМФ и цАМФ являются важными сигнальными молекулами и их концентрация служит одним из маркёров злокачественности опухоли.

Кроме перечисленных выше общеизвестных негеномных эффектов прогестерона гестагены обладают способностью повышать чувствительность резистентных опухолевых клеток к химиотерапии [2]. Основная причина развития резистентности к химиотерапии — повышение экспрессии и активности транспортного мембранного белка — Р-гликопротеина. Р-гликопротеин препятствует входу цитостатика в клетку и способствует его энергозависимому транспорту из клетки против градиента концентрации.

В настоящее время проводятся клинические испытания новых фармакологических препаратов — химиосенсибилизаторов. Это вещества верапамил, циклоспорин и их аналоги. Уже выявлен ряд нежелательных побочных эффектов, а главным недостатком препаратов является невозможность их применения как самостоятельных препаратов в онкологической практике, вследствие того что они не обладают проти-

воопухолевым действием. Гестагены как химиосенсибилизаторы обладают преимуществом как самостоятельные препараты, обладающие противоопухолевым действием в отношении гормонозависимых новообразований.

В опытах *in vitro* обнаружена способность гестагенов ингибировать активность Р-гликопротеина и снижать экспрессию его мРНК, что проявлялось в итоге увеличением цитостатического эффекта доксорубицина [2].

9.5.8. Химиосенсибилизирующая активность АБМП *in vitro*. С целью выявления химиосенсибилизирующей активности АБМП исследовали его влияние на цитостатическое действие доксорубицина. При комбинированном введении в инкубационную среду доксорубицина и АБМП наблюдается усиление цитостатического эффекта доксорубицина как в резистентных, так и в чувствительных к доксорубицину клетках MCF-7. Эффект усиления развивается на 6-е сутки инкубации с клетками при одновременном введении АБМП и доксорубицина (табл. 9.18).

Таблица 9.18

Усиление цитостатического действия доксорубицина, %, в присутствии гестагенов в культурах клеток при инкубации 6 сут

Клеточная культура, гестаген	MCF-7/WT	MCF-7/R
МПА, 10^{-5} М	47*	51*
МПА, 10^{-6} М	43*	Нет усиления
МПА, 10^{-7} М	43*	Нет усиления
АБМП, 10^{-5} М	30*	41*
АБМП, 10^{-6} М	31*	13
АБМП, 10^{-7} М	32,5*	Нет усиления

Концентрации доксорубицина, используемые в комбинации с гестагенами, составили 10^{-7} М и $5 \cdot 10^{-6}$ М для культур MCF-7/WT, MCF-7/R соответственно; * достоверное усиление цитостатического действия доксорубицина при $p < 0{,}01$.

Данные демонстрируют, что гестагены МПА и АБМП усиливают цитостатическое действие доксорубицина, однако МПА в большей степени, чем АБМП.

Далее был проведён анализ влияния гестагенов на аккумуляцию доксорубицина в опухолевых клетках MCF-7 и HeLa с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM-5 Pascal. Показано, что при предварительной инкубации клеток с гестагенами МПА и АБМП в течение 2 сут, доксорубицин ($5 \cdot 10^{-5}$ М конечная концентрация, инкубация с клетками 15 мин) накапливается в большей степени, чем в опытах в отсутствии гестагенов. Данные представлены в табл. 9.19.

Таблица 9.19

Влияние гестагенов на аккумуляцию доксорубицина в клетках MCF-7 и HeLa, в % относительно контроля

Клеточная культура	Дидрогестерон	МПА	Прогестерон	АБМП
MCF-7	87 ± 4	159 ± 8	94 ± 8	179 ± 6
HeLa	211 ± 10	100 ± 12	100 ± 4	215 ± 6

9.5.9. Химиосенсибилизирующая активность АБМП *in vivo*. Изучение АБМП *in vivo* как потенциального химиосенсибилизатора проводили на модели резистентного к винкристину, гормононезависимого лимфолейкоза мыши Р388. АБМП в дозе 50 мг/кг проявляет химиосенсибилизирующее действие, повышая цитостатический эффект винкристина на 16 % ($p < 0{,}001$) и ингибируя в комбинации с винкристином рост опухоли на 53 %. Винкристин как самостоятельный препарат ингибирует рост опухоли на 37 %. Так как клетки данной опухоли не содержат рецепторов прогестерона, химиосенсибилизирующая активность АБМП опосредована, вероятно, за счёт его взаимодействия с факторами МЛР, например за счёт ингибирования активности Р-гликопротеина, способствующему повышению чувствительности клеток к винкристину (рис. 9.8).

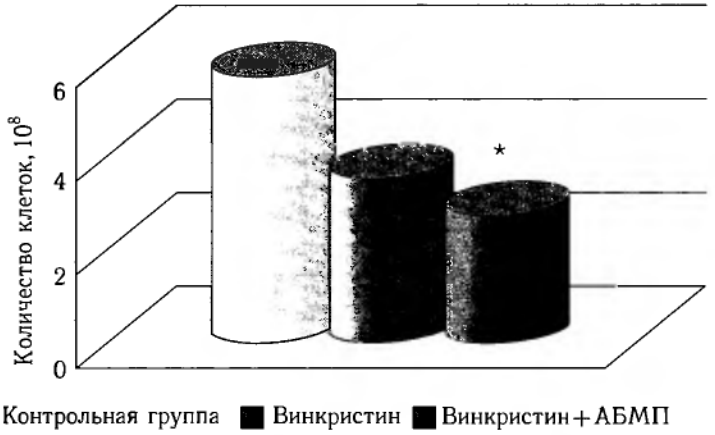


Рис. 9.8. Влияние АБМП в комбинации с винкристином на рост перевиваемого лимфолейкоза мыши Р388, резистентного к винкристину. Мышам линии DBA_2 привили лимфолейкоз Р388, резистентный к винкристину, 2 млн клеток/мышь, на следующий день группе «Винкристин» (7 мышей) ввели винкристин 1 мкг/г внутрибрюшинно (20 мкг/мышь), группе «Винкристин + АБМП» (7 мышей) — винкристин 1 мкг/г внутрибрюшинно (20 мкг/мышь) и через 2 ч бутагест 50 мг/кг перорально в масле. Контрольная группа (7 мышей) получила масло перорально. На 7 день после прививания подсчитали нарастание опухоли по количеству клеток в асцитной жидкости; * — достоверное отличие количества клеток в группе «Винкристин + АБМП» от группы «Винкристин» ($p < 0{,}001$)

На основании представленных результатов можно считать, что новый отечественный гестаген АБМП по результатам наших исследований является перспективным соединением для дальнейшего использования в акушерско-гинекологической и онкологической практике. В тесте Clauberg–McPhail АБМП у кроликов показал высокую гестагенную активность, превосходящую все препараты сравнения (прогестерон, левоноргестрел, АМП). По величине гестагенной активности соединения расположились следующим образом: АБМП > ацетомепрегенол > левоноргестрел > прогестерон. В то же время на морфологию эндометрия крыс АБМП оказал гестагенное действие, по силе сходное с левоноргестрелом. В экспериментах на крысах АБМП устанавливал уровень прогестерона в крови до среднего значения находящегося между контролем High и Low. Препараты сравнения (левоноргестрел, АМП, МПА) снижали уровень прогестерона в большей степени, чем АБМП. Основываясь на этих данных, можно утверждать, что АБМП обладает менее выраженными центральными эффектами, но более сильным периферическим гестагенным действием по сравнению с МПА и прогестероном и поэтому особенно перспективен в отношении поиска

средств для лечения эндометриоза. Благоприятным фактором следует признать отсутствие у АБМП анаболических и андрогенных эффектов, свойственных некоторым применяемым гетсагенам, например левоноргестрелу. Кроме того, АБМП, в отличие от прогестерона, в дозе 0,1 мг/кг не ингибирует синтез и экспрессию собственных рецепторов в миоутероцитах экспериментальных животных (крыс), следовательно при длительном использовании препарата вероятность развития толерантности к гормональной терапии по рецепторному механизму крайне мала.

Таким образом, АБМП обладает высокой гестагенной активностью, значительно превышающей препараты сравнения при отсутствии нежелательного андрогенного действия, что свидетельствует о наличии у АБМП избирательного действия на эндометрий и перспективность его применения при гестагенной недостаточности.

Важным и клинически значимым свойством АБМП явилась его способность подавлять жизнеспособность клеток РМЖ и РШМ человека. Основными органами-мишенями действия гестагенов являются матка и молочная железа. Нарушение гормонального статуса женщин может быть как причиной, так и следствием различных заболеваний женской половой системы, в том числе и злокачественного перерождения тканей матки и молочной железы. Таким образом, именно культуры клеток РМЖ и РШМ человека были выбраны нами в качестве объектов исследования для изучения цитостатической активности АБМП.

В настоящее время вопрос о наличии у всех препаратов класса гестагенов цитостатической активности является дискуссионным. В научной литературе описаны как пролиферативные, так и антипролиферативные свойства даже эндогенного гестагена прогестерона. Например, в физиологических концентрациях прогестерон способствует пролиферации клеток молочной железы, тогда как в высоких дозах прогестерон и его аналоги успешно применяются в лечении РМЖ. Исследования *in vitro* демонстрируют неоднозначное влияние гестагенов на пролиферацию клеток РМЖ человека, что связано как с рецепторным статусом опухоли, дозой гестагенов, временными диапазонами, так и с условиями культивирования. На стандартных клеточных культурах РМЖ человека T47D и MCF-7 (линия T47D описана как более насыщенная РП и РЕ культура клеток РМЖ, чем линия MCF-7) показано, что прогестерон вызывает начальную стимуляцию пролиферации клеток (первые 2 сут инкубации) и конечное торможение пролиферации (по прошествии более двух клеточных циклов) (S. D. Groshong, 1997). По данным (Thuneke и др., 2000), гестаген МПА оказывает на T47D также двухфазное действие: при инкубации в течение 24 и 48 ч стимулирует пролиферацию, а при 72 ч — её ингибирует. В исследованиях B. Formby, 1999 на линии T47D, максимальное ингибирование пролиферации (на 90%) наблюдается при инкубации с прогестероном в концентрации 10^{-7} М в течение 72 ч. Так, в концентрации 10^{-7}–10^{-6} М и инкубации в течение 72 ч прогестерон стимулирует апоптотические процессы — повышает экспрессию P53 и снижает экспрессию Bcl-2 в клетках T47D. Также отмечается способность прогестерона стимулировать апоптоз путём ингибирования экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 даже в присутствии эстрадиола (A. Gompel и др., 2000). В нашем исследовании гипотеза о проапоптотическом действии гестагенов не нашла подтверждения.

Другой возможный механизм цитостатического действия гестагенов связан с регуляцией ферментативной активности белков, ответственных за процессы клеточной пролиферации и клеточной гибели. Так, мишенью действия гестагенов в опухолевых клетках (по мнению Ahola и др., 2002) может являться так называемый связанный с G-белком рецептор 30 (G protein-coupled receptor — (GPR)30). Ап-регуляция этого рецептора МПА ведёт к инактивации ERK-1 и ERK-2, вследствие чего МПА индуцирует клеточную гибель. ERK-1 и ERK-2 являются MAP-киназами (mitogen-activated protein kinase) — ключевыми ферментами, регулирующими сигнальные каскады ре-

акций, вовлечённых в процессы клеточной пролиферации и клеточной гибели. Среди трёх основных MAP-киназ, представленных в тканях человека, MAP-киназы ERK-1 и ERK-2 наиболее свойственны опухолевым клеткам рака молочной железы. Снижение активности ERK-1 и ERK-2 наблюдается через 23 ч после введения МПА. Цитозольные рецепторы гестагенов могут непосредственно активировать цитозольные MAP-киназы, стимулируя пролиферцию. Этот эффект прогестероновых рецепторов B-типа зависит от наличия мутации в положении сер-294. Причём прогестероновый рецептор и без лиганда, а антагонист RU486 может увеличить пролиферацию в клетках с ПР-В.

Однако не на всех клеточных моделях гестагены демонстрируют антипролиферативное действие. Гестаген МПА вообще не влиял на пролиферацию клеток РМЖ T47D, тогда как тормозил пролиферацию клеток другой клеточной культуры, РМЖ SKBR-3, более чем на 50%. Гестагены, прогестерон, R5020, МПА, норэтистерон, левоноргестрел, гестоден и другие стимулировали пролиферацию клеток РМЖ T47D, полученных из американской коллекции клеточных культур, и не влияли на пролиферацию клеток РМЖ T47D, полученных из австралийской коллекции. Биологические эффекты гестагенов в культурах клеток РМЖ весьма разнообразны и зависят от типа клеточной линии, состава среды культивирования и их концентрации. Показано, что существует корреляция между выраженностью антипролиферативного действия гестагенов и количеством рецепторов прогестерона в той или иной клеточной культуре.

Опухоли шейки матки более чувствительны к действию гестагенов. Немногочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что в отношении РШМ прогестины обладают антипролиферативным действием. Этиологию РШМ связывают с наличием в органе реплицирующегося вируса папилломатоза HPV-16. Известно, что компоненты вируса — белки E2 и E7 вызывают апоптотическую гибель клеток РШМ, а прогестерон увеличивает вызванный этими белками апоптоз. Кроме того, прогестины способны тормозить синтез ДНК клеток РШМ независимо от содержания в них рецепторов прогестерона (M.J. Diaz-Perez, 1998). Такой негеномный цитостатический эффект прогестерона в отношении РШМ пока полностью неясен. Методом проточной цитофлуориметрии установили, что под действием прогестерона в микромолярных концентрациях клеточный цикл клеток РШМ тормозится в фазе G1/G0, происходит уменьшение размеров и фрагментация ядер клеток, что свидетельствует о гибели клеток путём апоптоза и некроза.

В наших исследованиях АБМП и гестагены сравнения показали выраженную цитостатическую активность. В отношении клеток рака молочной железы человека MCF-7 АБМП обладает более выраженным цитостатическим действием, чем прогестерон и сходным цитостатическим действием с МПА ($p < 0{,}05$). АБМП также обладает более выраженным цитостатическим действием, чем МПА и прогестерон в культуре клеток HeLa ($p < 0{,}05$). Цитостатическое действие гестагенов опосредовано связыванием с рецепторами прогестерона с высоким сродством, что показано как для клеток MCF-7, так и HeLa.

По нашему мнению, противоречия в данных о стимулирующем или ингибирующем влиянии гестагенов на рост клеток рака молочной железы могут быть связаны как с продолжительностью инкубации гестагенов с клетками, так и с условиями инкубации и выбором самого гестагена, а также зависят от выбранного типа клеточной линии и её рецепторного статуса, присутствия эстрогенов, факторов роста и характера функционирования их рецепторов.

Описанные выше свойства препаратов на основе гестагенов позволяют считать этот класс лекарственных средств адекватным средством борьбы с гормонозависимыми опухолями женской половой сферы ввиду двух основных причин:

1) гестагены обладают цитостатическим действием в отношении эстрогензависимых опухолевых клеток;

2) гестагены обладают химиосенсибилизирующим действием, т. е. повышают чувствительность опухолевых клеток к действию цитостатиков.

Вместе с тем, эти утверждения могут быть справедливыми не во всех случаях и зависеть от многих факторов (мутаций в рецепторах, соотношения подтипов рецепторов и др.). Будущие исследования должны способствовать выработки алгоритма направленного использования гестагенов или их антагонистов для лечения или профилактики гиперпролиферативных процессов в тканях-мишенях.

Новый гестаген АБМП, представленный в работе, является оригинальной отечественной разработкой, отличается от существующих аналогов высокой гестагенной активностью и пролонгированным действием, не обладает андрогенной и минералкортикоидной активностью, нетоксичен в высоких дозах. Уникальным и экономически выгодным является способ получения АБМП восстановлением мегестрола ацетата боргидридом натрия с последующей этерификацией продукта восстановлением ангидридом масляной кислоты. С целью повышения выхода и упрощения выделения целевого продукта в чистом виде реакционную смесь после этерификации для удаления избытка масляной кислоты обрабатывают раствором аммиака.

Кроме того, АБМП обладает выраженной цитостатической активностью, превосходящей таковую препарата сравнения — МПА. Выявлена химиосенсибилизирующая активность АБМП *in vivo* и *in vitro*. Впервые показан химиосенсибилизирующий эффект гестагена на гормононезависимый перевиваемый острый лимфолейкоз мыши Р388, резистентный к винкристину, что свидетельствует о возможности применения этого класса стероидных гормонов в терапии гормононезависимых резистентных острых лимфолейкозов.

Указанные свойства АБМП позволяют считать его перспективным для дальнейшего клинического изучения как противоопухолевого и химиосенсибилизирующего препарата с целью применения в терапии опухолей, чувствительных к женским половым стероидным гормонам. АБМП является оригинальным отечественным гестагеном, пригодным для применения внутрь, конкурентоспособен с зарубежными препаратами, содержащими гестагены, а по отдельным показателям превосходит их, что очень ценно и в клиническом, и в социальном, и в экономическом отношении.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 9

1. *Кузьмин А.А., Прилепская В.Н., Ледина А.В.* Контрацептивы нового поколения // Русский медицинский журнал. 1998. Т. 6, № 5. С. 312–316.
2. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М., 1999. — 640 с.
3. *Серов В.Н., Никитин С.В.* Новые возможности лечебного действия комбинированных оральных контрацептивов // Гинекология. 2000. Т. 2, № 6. С. 180–183.
4. *Сметник В.П.* // Климактерий и менопауза. 2003. № 1. С. 3–7.
5. *Шимановский Н.Л.* Идеальное сочетание сверхнизких доз стероидных гормонов в новом контрацептивном монофазном препарате Логесте // Планирование семьи. 1999. № 2. С. 30–32.
6. *Archer D.F., Gast V.J.* An investigation of ovulation inhibition with a low-dose combined oral contraceptive containing 75 mu g gestodene and 20 mu g ethinylestradiol // Gynecol. Endocrinol. 1998. V. 12. Suppl. 4. P. 7–12.
7. *Back D.J., Grimmer S.F.M., Shenoy N., Orme M.L.E.* Plasma concentrations of 3-keto-desogesrel after oral administration of desogestrel and intravenous administration of 3-keto-desogestrel // Contraception. 1987. V. 35. P. 619–626.
8. *Bloemenkamp K.W.M., Helmerhorst F.M., Dersjant-Roorda M.D. et al.* A comparative clinical investigation of two low-dose oral contraceptives containing either 75 mu g gestodene or 150 mu g desogestrel combined with 20 mu g ethinylestradiol: effect on hemostasis, lipid metabolism and carbohydrate metabolism // Gynecol. Endocrinol. 1998. V. 12. P. 21–30.
9. *Bocker R., Kleingeist B.* Der Einflus von Dienogest auf das humane Cytochrome P-450-Enzymsystem *in vitro* // In: Dienogest Praklinik und Klinik eines Gestagens Teichmann AT / Ed. W. de Gruyter. — Berlin, 2 Auflage, 1995. P. 141–147.
10. *Brown T.R., Bullock L., Bardin C.W.* In vitro and in vivo binding of the androgen receptor of mouse kidney: correlation with biological activities // Endocrinology. 1979. V. 105. P. 1281–1290.
11. *Bruni V., Croxatto H., De La Cruz J. et al.* A comparison of cycle control and effect on well-being of monophasic gestodene-, triphasic gestodene- and monophasic desogestrel-containing oral contraceptives // Gynecol. Endocrinol. 2000. V. 14. P. 90–98.
12. *Colletta A.A., Wakefield L.M., Howell F.V. et al.* // J. Clin. Invest. 1991. V. 87. P. 277–283.
13. *Dusterberg B., Ellman H., Muller U., Rowe E., Muhe B.* A three-year clinical investigation into efficacy, cycle control and tolerability of a new low-dose monophasic oral contraceptive containing gestodene // Gynecol. Endocrinol. 1996. V. 10. P. 33–39.
14. *Endricat J., Jaques M., Mayerhofer M. et al.* A Twelve-Month Comparative clinical investigation of two low-dose oral contraceptives containing 20 mkg ethinylestradiol / 75 mkg gestoden and 20 mkg ethynilestradiol / 150 mkg desogestrel, with respect to efficacy, cycle control and tolerance // Contraception. 1995. V. 52. P. 229–35.
15. *Endricat J., Dustenberg B., Ruebig A. et al.* Comparison of efficacy, cycle control, and tolerability of two low-dose oral contraceptives in a multicenter cllinical study // Contraception. 1999. V. 60. P. 269–274.
16. *Erkkola R., Hirvonen E., Luikku J. et al.* Ovulation inhibitors containing cyproterone acetate or desogestrel in the treatment of hyperandrogenic symptoms // Acta obstet gynecol. Scand. 1990. V. 69. P. 61–65.
17. *Fuhrmann U., Slater E.P.* Fritzemeier K-H. Characteriazation of the novel progestin gestodene by receptor binding studies and transactivation assays // Contraception. 1995. V. 51. P. 45–52.

18. *Gast M.J., Grabb G.* A review of cycle control with a low-dose oral contraceptive containing 75 mkg gestodene and 20 mkg ethinylestradiol // Gynecol. Endocrinol. 1998. V. 12. Suppl. 4. P. 31–37.
19. *Graser T., Oettel M.* Organ targeting with the oral progestin dienogest // Drugs of Today. 1996. V. 32. Suppl. H. P. 43–55.
20. *Graser T., Hoffmann H., Zimmermann H., Oettel M.* Lafamme: A new oral preparation for continuous combined hormone replacement therapy in postmenopausal women // Drugs of Today. 2001. V. 37. Suppl. G. P. 17–27.
21. *Graser T., Koytchev R., Romer T., Georgiev D.B. et al.* Dienogest as a progestin for hormone replacement therapy // Drugs of Today. 1999. V. 35. Suppl. C. P. 1215–126.
22. *Goeretzleher G.* The role of progestogens in hormone replacement // Drugs of Today. 2001. V. 37. Suppl. G. P. 1–8.
23. *Guengerich F.P.* mechanism based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 363–371.
24. *Hammond G.L., Bocchinfuso W.P., Orava M., Smith C.L.* van den End Enk A. Serum distribution of two contraceptive progestins: 3-ketodesogestrel and gestodene // Contraception. 1994. V. 50. P. 301–318.
25. *Hirvonen E.* Progestins // Maturitas. Suppl. 1996. V. 23. P. S. 13–S. 18.
26. *Hobe G., Hilltshein H.G., Kuntzel B., Klinger G.* Studies on non-protein boundf dienogest in plasma of different species // Naunyn-schmiedeber's Arch Pharmacol. Suppl. 1993. V. 347. P. R44.
27. *Katsuki Y., Tkano Y., Futamura Y. et al.* Effects of dienogest, a synthetic steroid on experimental endometriosis in rats // Europ. J. Endocrinol. 1998. V. 138. P. 216–226.
28. *Schurmann R., Holler T., Benda N.* Estradiol and drospirenone for climacteric symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety and efficacy of three dose regimes // Climacteric. 2004. V. 7. P. 189–196.

Глава 10

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ АНТИГОРМОНОВ

Антигормоны — это эндогенные и экзогенные вещества, избирательно подавляющие биологическую активность гормонов. Часто антигормоны являются структурными аналогами гормонов; не обладая самостоятельной гормональной активностью, они блокируют синтез, секрецию или периферическое действие гормонов. Антигормоны взаимодействуют с лигандсвязывающим участком рецептора стероидного гормона, конкурентно ингибируя рецептор. В некоторых случаях антигормоны также проявляют агонистическую активность, особенно при связывании с некоторыми случайными мутантными рецепторами. Это наблюдение, вместе с обнаружением смешанного взаимодействия антигормонов с некоторыми классами стероидных рецепторов, необходимо для поиска более эффективных и надёжных антигормонов. Расшифровка кристаллической структуры лигандсвязывающего участка стероидных рецепторов и идентификация нелигандной активации стероидных рецепторов дали значительную информацию, которая может быть использована в плодотворном поиске новых поколений антигормонов.

Стероидные гормоны представляют собой липофильные молекулы, которые влияют на биологические процессы, начиная с контроля над репродукцией и заканчивая посредничеством при стрессовой реакции. Неконтролируемая продукция стероидных гормонов может существенно изменять биологические реакции. Изменения реакций в некоторых случаях могут вызывать серьёзные нарушения здоровья. По этим причинам значительное количество работ посвящено разработкам различных антигормонов, которые могут ингибировать действие стероидных гормонов в случаях их чрезмерной продукции или гиперактивности.

В тканях-мишенях стероидные гормоны, в первую очередь, взаимодействуют с рецепторами. В отсутствии гормона эти рецепторы существуют в виде неактивных комплексов с сопровождающими белками. Стероидные гормоны, замещая шаперон-белки, взаимодействуют с рецепторами. Изменение конформации рецептора запускает каскад ферментативных рецепторов. Связывание с цитозольными рецепторами опосредует трансформацию гормонального сигнала в биохимический ответ клетки, выражающийся в изменении функционирования ядерного аппарата, т. е. влияет на скорость транскрипции определённых генов и, соответственно, на скорость синтеза кодируемых генами белков [1–4]. Действие стероидных гормонов на генную экспрессию нейтрализуется антигормонами, которые также связываются с рецепторами, но обладают противоположным эффектом.

Антигормоны могут быть как стероидной, так и нестероидной природы. Стероидные и нестероидные антигормоны являются конкурентными ингибиторами рецепторов стероидных гормонов. Они связываются с теми же рецепторами, что и естественные лиганды. Во многих случаях они могут быть неспецифичными (взаимодействуют более чем с одним рецептором), что при применении вызывает много побочных эффектов.

10.1. Антипрогестины

Функционирование и развитие женской репродуктивной системы контролируется прогестероном, в связи с этим некоторые достижения в изучении антипрогестинов были использованы для улучшения женской репродуктивной функции. Philibert, Deraedt и Teutsch были первыми, кто достиг этой цели в 1981 г. с проектом антипрогестина RU38486, известным также как RU486 или мифепристон [5] (рис. 1). С того времени несколько фармацевтических компаний, включая Schering Roussel–Uclaf и Organon, синтезировали огромное количество дополнительных антипрогестинов, большинство из которых представляют 11-β-арилзамещенные стероиды (рис. 10.1).

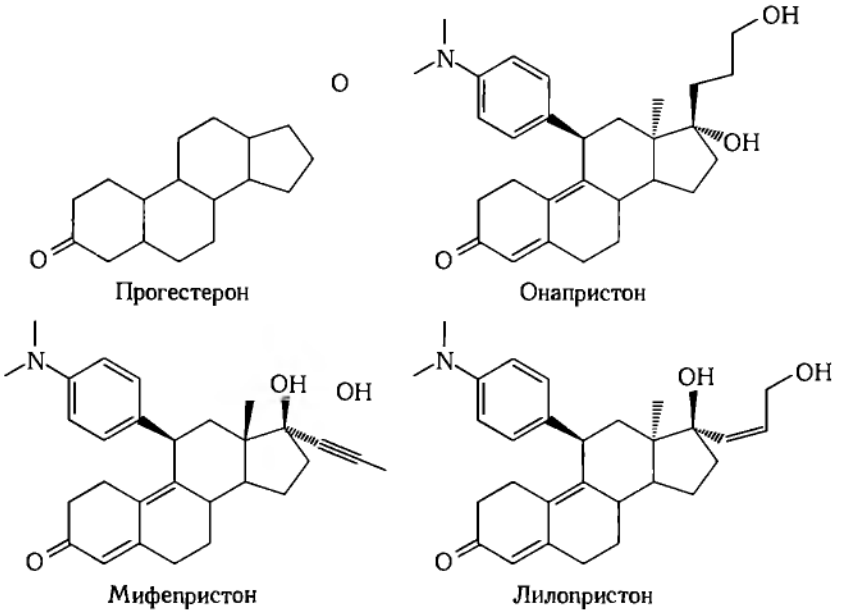


Рис. 10.1. Химическое строение прогестерона и антагонистов гестагенных рецепторов

Клинические возможности антипрогестинов были оценены преимущественно на примере RU486, но затем начали исследовать фармакологические свойства онапристона и лилопристона. Наиболее распространённое клиническое применение антипрогестинов — прерывание беременности на ранних стадиях. В нормальных физиологических условиях под действием прогестерона цервикальный канал находится в закрытом состоянии. Мифепристон, в частности, подавляет активность прогестерона, что приводит к релаксации шейки матки, открытию цервикального канала и, таким образом, даёт возможность хирургического вмешательства для прерывания беременности в первом триместре. На более поздних сроках беременности препарат, подавляя действие прогестерона, потенцирует эффект простагландинов, что даёт возможность достичь медикаментозного прерывания беременности с использованием меньших доз простагландинов.

Дополнительно были показаны контрацептивные способности антипрогестинов. Путём блокирования овуляции и индукции глубокой альтерации эндометрия, они предотвращают имплантацию оплодотворённой яйцеклетки. Антипрогестины оказывают антипролиферативный эффект на нормальный эндометрий и при лечении опухолей, таких как эндометриозы, мочеполовые лейкомиомы, рак лёгких и менин-

гиомы. Перечисленные выше терапевтические способности сделали антипрогестины полезными составляющими в клиническом применении. Возможно, что в дальнейшем их способность ингибировать активность прогестерона в различных экспериментальных системах сделает их важным инструментом для предотвращения избыточного воздействия прогестерона.

Все современные известные антипрогестины взаимодействуют с лигандсвязывающим доменом прогестеронового рецептора, конкурентно ингибируя связывание с ним прогестерона. При обсуждении молекулярного механизма антипрогестиновой активности и его потенциального значения в клинической практике необходимо принять во внимание, что прогестероновые рецепторы человека экспрессируются в двух изоформах: B-форме (hPR-B) с молекулярной массой 10 000, состоящей из 933 аминокислот, и A-форме (hPR-A), которая содержит 164 аминокислоты, совпадающие с N-концевыми аминокислотами B-формы, с молекулярной массой 117 000. Эти две изоформы получаются в результате транскрипции с разных промоторов [6] или в результате различной инициации транскрипции с одной мРНК [7]. Показано, что hPR-B выступает как главный гормониндуцибельный фактор транскрипции и его активация может быть заблокирована антипрогестинами. В отличие от hPR-B, транскрипционная активность hPR-A выше и клеткоспецифична [7]. Было замечено, что в клеточных линиях, у которых hPR-A транскрипционно неэффективен, существует возможность трансдоминантной репрессии функции этой изоформы рецепторов, которая, в свою очередь, влияет на активность hPR-B в присутствии прогестерона так же хорошо, как и в присутствии антипрогестинов [8].

До конца ещё не ясно, почему комплекс прогестеронового рецептора с антипрогестином функционально не активен. Возможно, что конформация прогестеронового рецептора по-разному изменяется при связывании с агонистами и с антагонистами. Такие изменения проявляются при ограничении протеолитической активности и при картировании моноклональными антителами [9]. Связывание с агонистом ведёт к образованию компактной структуры, переводящей лигандсвязывающий домен гестагенного рецептора в устойчивое к протеазам пищеварительного тракта и к антительному распознаванию состояние. Связывание с антагонистом ведёт к образованию непрочной структуры, которая характеризуется наличием участка длиной в 30 кДа, который распознаётся антителами и доступен для протеаз [10]. Различия в конформациях при связывании агониста и антагониста с прогестероновыми рецепторами могут быть вызваны тем, что они взаимодействуют с разными участками лигандсвязывающего домена рецептора прогестерона, что было показано в различных мутационных анализах [11].

Разные лиганды могут быть сгруппированы в агонисты или антагонисты на основе конформации, которую они формируют у прогестеронового рецептора. Недавно Wagner и др. анализировали 16-замещённый аналог RU486, новый антипрогестин, который индуцирует изменение конформации, отличное от той, которое вызывает RU486. Это изменение структуры рецептора вызывает смешанную агонист-антагонистическую активность, что также может быть подтверждено экспериментом на клеточной культуре.

Хотя различия в конформации появляются уже сразу после связывания с агонистом и антагонистом, оба типа лигандов позволяют протекать первым двум этапам активации рецептора: диссоциации на белковые составляющие и димеризации рецептора. Однако ещё неизвестно, блокируют ли антипрогестины транскрипционную активность ингибированием следующей ступени активации рецептора, в частности ассоциацию рецептора и ДНК, или на каком-то другом этапе дальнейшего связывания с ДНК [2].

По механизму действия существуют два типа антипрогестинов: первый тип антипрогестинов (13-α-метил-19-нор-стероиды) представлен ZK98299 (анапристон), который предотвращает ассоциацию рецептора прогестерона с ДНК, и второй тип антагонистов (13-β-метил-19-нор-стероиды), представленный RU486 и ZK98734, которые вызывают стойкое связывание промотора рецептора с ДНК в экспериментах *in vitro*. Первый тип антагонистов может препятствовать трансактивации, стимулируемой рецепторами прогестерона, связыванию с прогестерон-отвечающими элементами. В то же самое время второй тип антагонистов может действовать на стадиях, следующих после связывания с ДНК.

В процессе функционирования рецептора прогестерона важное значение имеет его фосфорилирование, которое происходит в три этапа. Первый этап является основным, и в результате этого фосфорилирования происходит повышение ответа на прогестерон. Второй этап — прогестеронзависимое фосфорилирование, длительность которого не превышает 10 мин. Третий этап — ДНК-зависимое фосфорилирование, происходящее после связывания рецептора с прогестерон-отвечающими элементами. Антагонист второго типа RU486 стимулирует первый и второй этапы фосфорилирования. В присутствии антагониста первого типа ZK98299 не происходит значительного фосфорилирования в участках рецептора, связывающих гормон и связывающихся с ДНК. Таким образом, антагонистическая активность ZK98299 может быть отчасти вызвана его неспособностью вызывать фосфорилирование критических участков прогестеронового рецептора.

Классифицировать антипрогестины можно также по типу ответа прогестеронового рецептора на антигормон и по уровню активации протеинкиназы А. Антипрогестины второго типа, такие как RU486, могут функционировать как агонисты в присутствии активаторов протеинкиназы А, например в присутствии цАМФ. Антипрогестины первого типа, такие как ZK98299, быть такими агонистами не могут. С помощью агонистических свойств RU486 можно объяснить вызываемые пролиферативные эффекты в эндометрии матки у женщин в постменопаузе при приёме RU486 [2].

Полученные результаты показывают существование по крайней мере двух типов антипрогестинов и показывают, что антагонисты первого типа могут быть определены как более слабые, в отличие от антагонистов второго типа.

Большое значение имеет способность антипрогестинов угнетать пролиферацию опухолевых клеток, что делает их полезными в борьбе с раком молочной железы, лейкомиомой мочеполовой системы и эндометриозами и состоит в ингибировании клеточной пролиферации [13].

Антипролиферативное действие антипрогестинов проявляется не только в результате прогестеронового антагонизма. Например, ZK98299 способен блокировать рост карциномы молочной железы у животных с удалённым яичником, у которых уровень прогестерона в сыворотке ниже определяемого. Большинство исследований антипролиферативных эффектов антипрогестинов выполнялись на раковых клетках молочной железы *in vitro* или на клетках опухоли молочной железы грызунов *in vivo*. На клетках рака молочной железы было показано, что антипрогестины вызывают блокирование клеточного цикла, останавливая переход клеток в G_1-фазу. На опухолевых клетках молочной железы грызунов *in vivo* терапия с антипрогестинами индуцирует апоптоз. Для объяснения возможных механизмов описанных эффектов исследования были сфокусированы на ключевых регуляторах клеточного цикла, таких как циклины, циклин-зависимые киназы и их ингибиторы. Группа учёных из Сазерленда провела несколько экспериментов на клетках рака молочной железы *in vitro*, которые показали снижение уровня циклина-D_3 и циклина-Е и повышение уровня циклин-зависимых ингибиторов киназ p21 после обработки клеток препаратом RU486 [14].

В то же время Heikinheimo и другие не нашли изменений в экспрессии p21 мРНК в опухолях эндометрия обезьян, которым вводили RU486.

10.1.1. Применение мифепристона в акушерстве и гинекологии. Мифепристон, известный также под названием RU486, представляет собой синтетический стероидный препарат для перорального применения, производное норэтиндрона, обладающий высокой аффинностью к прогестероновым и глюкокортикоидным рецепторам. Препарат разработан специально для прерывания ранней беременности. Будучи антагонистом прогестерона и глюкокортикоидов, мифепристон потенциально имеет и другие показания к применению.

В исследованиях эффективности применения антипрогестинов для прерывания ранней беременности, проведённых в 1983–87 гг., применялся только мифепристон, и процент успешных результатов был недостаточно высок, от 63,3 до 89,4%. Результаты применения повторных доз препарата не отличались значительно от результатов применения однократной дозы 500 мг. В последующих исследованиях по стандартному протоколу применялись дозы 200, 400, 600 и 800 мг, и результат применения малых доз 200 и 400 мг оказался хуже, чем дозы 600 мг. Из числа случаев с безуспешным результатом выше всего процент продолжающейся беременности приходился на дозу 200 мг, особенно при включении в исследование женщин с беременностью свыше 41 дня — 26,7% против 8,7% при применении дозы 600 мг. Таким образом, дальнейшие исследования по однократному применению проводились с дозой 600 мг, но и в этом случае процент успеха оставлял желать лучшего — от 76,3% до 87,0% [15].

Бигдеман и Свон установили, что применение простагландинов спустя 36–48 ч после приёма мифепристона существенно улучшает результат. Простагландины стимулируют сокращения миометрия, а антипрогестины повышают концентрацию простагландинов в миометрии путём ингибирования простагландиндегидрогеназы — фермента, расщепляющего активные ПГЕ2 и ПГF2. Антипрогестины также повышают чувствительность миометрия к экзогенным простагландинам. Таким образом, недостаточно эффективное применение только мифепристона было дополнено применением простагландинов спустя 36–48 ч, что значительно улучшило результат. В настоящее время этот метод медикаментозного прерывания беременности применяется во Франции, Швеции и Великобритании и других странах.

Впервые в комбинации с мифепристоном был применён синтетический аналог ПГЕ2 сульпростон в виде инъекций. Однако отмечались побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы (38-летняя курящая женщина умерла от инфаркта миокарда), в результате чего препарат был отвергнут. В настоящее время применяют препараты — аналоги ПГЕ1: мизопростол (перорально или вагинально) или гемепрост (вагинально). Полный успех в 95% достигается при применении мифепристона в дозе 600 мг, с последующим применением мизопростола по 400 мг внутрь при сроке до 49 дней аменореи, или с применением гемепроста в дозе 1 мг вагинально при сроке до 63 дней аменореи. На более чем 400 000 случаев применения не отмечено побочных действий этих двух препаратов в отношении сердечно-сосудистой системы [15].

Антипрогестины имеют ещё несколько показаний к применению в акушерстве и гинекологии. В дополнение к своей способности усиливать сокращения миометрия, антипрогестины также расслабляют мускулатуру и расширяют шейку матки. Показано, что антипрогестины действуют не путём стимуляции продукции эндогенных простагландинов, а их активность опосредуется медиаторами воспаления и такими агентами хемотаксиса, как цитокины (например, интерлейкин-8 и интерлейкин-1). Было показано, что прогестерон угнетает, а мифепристон стимулирует высвобождение интерлейкина-8 в хориодецидуальных клетках человека *in vitro*. Благодаря своему действию на шейку матки антипрогестины пригодны при предоперационной

подготовке женщин к вакуумной аспирации в первом триместре. Мифепристон, назначаемый обычно за 48 ч до хирургического аборта, так же эффективен, как и простагландины, но имеет меньше побочных эффектов.

Снижение резистентности шейки матки мифепристоном облегчает механическую дилатацию и сокращает время хирургического вмешательства. Выявлена достоверная зависимость между дозой мифепристона и продолжительностью хирургического вмешательства. Так, в группе, получавшей 600 мг мифепристона, время вмешательства было на 4 мин меньше, чем в группе, получавшей плацебо. Преимущества мифепристона перед аналогами простагландинов и механическим расширением шейки матки заключаются в простоте применения (нет необходимости мониторинга или госпитализации перед вакуумной аспирацией) и безопасности: боли в животе средней интенсивности, не страдает гемодинамика. Что касается побочных эффектов, в клинических исследованиях не было случаев тяжёлых кровотечений после применения мифепристона и до хирургического вмешательства. Кровопотеря во время и после операции была сравнимой при применении мифепристона и без него.

Продолжает изучаться возможность применение мифепристона для родовозбуждения. В этом направлении нет чёткого определения относительно его дозировки. Необходимо больше данных о безопасности применения препарата, принимая во внимание бóльшую частоту развития дистресс-синдрома у новорождённых при применении мифепристона, чем в плацебо-группе, выявленное в ряде исследований.

Контрацептивное действие. В качестве средства срочной посткоитальной контрацепции, при применении мифепристона в дозе 600 мг получены результаты, сравнимые с применением высоких доз эстрогенов и прогестинов. Механизм его контрацептивного действия на органы-мишени зависит от времени и дозы назначения. Так, при назначении RU486 в высоких дозах в фолликулярную фазу менструального цикла подавляется синтез эстрадиола, созревание фолликула, овуляция, не наблюдается пик лютеинизирующего гормона (ЛГ). В связи с тем что эндометрий более чувствителен к действию мифепристона, чем гипоталамус и гипофиз, применение более низких доз препарата приводит к селективному изменению эндометрия без нарушения синтеза гормонов, фолликулогенеза и овуляции. То же действие мифепристона наблюдается при назначении в раннюю лютеиновую фазу сразу после овуляции. Назначение препарата в середину лютеиновой фазы приводит к повышению сократимости матки и индуцирует кровотечение в результате выброса простагландинов, повышения проницаемости капилляров с последующей миграцией лейкоцитов и цитокинов в эндометрий, что приводит к некрозу и отторжению эндометрия.

Исходя из механизма действия мифепристона предложено несколько схем его применения с целью контрацепции:

1) 0,5 мг ежедневно или 2,5 мг еженедельно;

2) 10 мг с 1-й по 15-й день месячного цикла, далее — 5 мг номегестрола ацетата с 16-й по 28-й день месячного цикла;

3) 200 мг одномоментно через день после наступления пика ЛГ;

4) 600 мг одномоментно в течение 72 ч после полового акта.

По мнению многих исследователей, наиболее перспективным является применение RU486 в качестве «ежемесячной пилюли» и как метода экстренной посткоитальной контрацепции. При назначении RU486 18 женщинам в дозе 20 мг через день после пика ЛГ, Bygdeman и др. наблюдали лишь одну беременность после совокупного применения препарата в течение 80 месяцев. О высокой эффективности RU486 в качестве экстренной контрацепции говорят результаты исследования Webb и др. Они сравнивали эффективность применения RU486 с традиционным режимом Юспе (высокие дозы комбинации эстрогена и гестагена) или назначением 600 мг

даназола дважды через 12 ч. Частота наступления беременности составила 0,4, 1,3 и 3,5 % соответственно. Кроме того, при применении RU486 наблюдается меньше побочных эффектов. Единственным неудобством назначения RU486 является задержка менструального кровотечения, в связи с чем у женщины возникает опасение, что наступила беременность. Данное неудобство компенсируется применением домашних тестов на беременность [16].

Ценной является возможность применения мифепристона в качестве контрацептива женщинами, которым противопоказаны пероральные контрацептивы. К ним относятся пациентки с эндометриозом, миомой матки, после лечения гормонально-зависимых опухолей и т. д.

Антипролиферативный эффект мифепристона. Антипрогестины были предложены при лечении опухолей, содержащих рецепторы стероидных гормонов, таких как менингиома. Антипрогестины замедляют рост клеток менингиомы в культуре и уменьшают размеры человеческой менингиомы, имплантированной мышам. В пилотных исследованиях пациенты с неоперабельной менингиомой принимали по 200 мг мифепристона в день, у них был получен выраженный эффект, подтверждённый уменьшением размеров опухоли по данным компьютерной и магнитно-резонансной томографии. В клинических исследованиях, проводимых среди больных эндометриозом, при назначении мифепристона в дозе 50 мг в день в течение 6 месяцев, показано уменьшение тазовых болей и степени проявления болезни, что подтвердилось данными лапароскопии [17].

Мифепристон также применялся у больных с лейомиомами. В трёхмесячном исследовании, при применении 25 и 50 мг препарата в день, отмечено достоверное уменьшение объёма лейомиомы.

Исследования, проводимые на животных, показали, что антипрогестины могут быть применены и при других опухолях, включая глиомы, опухоли яичников, рак простаты и эндометрия.

10.1.2. Антиглюкокортикоидное действие. Мифепристон связывается с глюкокортикоидными рецепторами и проявляет потенциальную антиглюкокортикоидную активность, что важно при синдроме Кушинга. Для проявления антиглюкокортикоидного эффекта требуются большие дозы, чем для антипрогестинового. Для лечения синдрома Кушинга, возникшего в результате эктопической продукции адренокортикотропного гормона и карциномы надпочечника, использовались постоянно высокие дозы мифепристона — от 5 до 22 мкг/кг/сут. В результате нормализовался фенотип больного, исчезла депрессия, снизилось артериальное давление, нормализовался углеводный метаболизм, а также метаболизм половых и тиреоидных гормонов, изменённый вследствие избытка глюкокортикоидов. Однако мифепристон не может применяться при болезни Кушинга, при которой гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система интактна. В этих условиях вызванное мифепристоном повышение секреции адренокортикотропного гормона и кортизола может преодолеть блокаду глюкокортикоидных рецепторов.

Мифепристон может быть использован при подготовке больного с синдромом Кушинга к операции. Более того, по сравнению с другими препаратами, используемыми в этой области, он имеет гораздо меньше побочных эффектов.

10.2. Антиэстрогены

Одним из слагаемых успеха в лечении рака молочной железы (РМЖ), важнейшей составляющей противоопухолевого лекарственного воздействия являются достижения эндокринной терапии. Рак молочной железы находится на первом месте среди

злокачественных заболеваний у женщин и является основной причиной их смерти в возрасте от 40 до 55 лет [19]. Опухоли молочной железы во все времена были и остаются большой проблемой для онкологов. Учёные и врачи пытаются с помощью новых методик лечения, новых подходов, новых препаратов найти оптимальный способ воздействия на болезнь. Поиски всё ещё продолжаются. Основной проблемой является установление причин возникновения той или иной патологии для более лёгкого выявления в дальнейшем способов борьбы с ней. В данной ситуации эндокринная терапия помогает в лечении РМЖ, так как считается, что одной из причин развития заболевания являются гормональные нарушения.

Ещё 100 лет тому назад было показано, что у некоторой популяции больных опухоль РМЖ является гормональнозависимой. Впервые этот феномен был замечен шотландским учёным-медиком George Beatson, который стал применять у молодых женщин, болеющих раком молочной железы, овариэктомию.

В развитии РМЖ играет роль множество факторов — генетических, метаболических и экологических. Если представить модель развития злокачественной опухоли, то наследственные генетические факторы (например, наследственность по одному патологическому рецессивному онкогену или более) в сочетании с факторами внешней среды (например, диета) приводят к образованию клона малигнизированных клеток. А их неконтролируемый рост, инвазия и метастазирование уже могут являться результатом воздействия неонкогенных факторов (например, эстрогенов). Предполагается, что в модель развития рака должны входить процессы, угнетающие врождённый контроль за удалением переродившихся клеток. Наиболее эффективной является диагностика опухоли на раннем этапе, так как от этого зависит выбор лечения [20].

Рак молочной железы считается наиболее чувствительным к противоопухолевой лекарственной терапии. Она представлена двумя видами — химиотерапией и гормонотерапией. У пациенток с первичным РМЖ химио- и гормонотерапия эффективно предотвращает развитие рецидивов, метастазов и увеличивает продолжительность жизни. У пациенток с диссеминированным процессом она способствует повышению качества жизни, так как уменьшение опухолевой массы приводит к уменьшению проявлений клинической симптоматики.

Нормальные клетки молочной железы и их злокачественные двойники очень чувствительны к действию в физиологических концентрациях стероидных гормонов, особенно эстрогенов, прогестинов и андрогенов. Их действие осуществляется как через стероидные гормональные рецепторы, так и через аутокринные и паракринные механизмы.

Какая-то часть раковых клеток сохраняет протеины эстрогенных и гестагенных рецепторов, и, соответственно, их клеточный рост и развитие зависят от гормонального влияния [21]. Клетки, не имеющие гормональных рецепторов, также подвержены гормональным влияниям через вышеперечисленные факторы роста, правда в меньшей степени.

10.2.1. Частичные антиэстрогены и истинные антиэстрогены. Все антиэстрогены являются конкурентными ингибиторами эстрадиольного связывания с эстрогенными рецепторами (ЭР). В достаточно высоких концентрациях они блокируют все ЭР, являющиеся промежуточным звеном в активации транскрипционных функций. Однако тамоксифен — антиэстроген, который используют преимущественно для лечения рака молочной железы, не полностью достигает этой цели. Тамоксифен является частичным антагонистом эстрогена — в клетках молочной железы он полностью блокирует ЭР, а в клетках эндометрия он активирует ЭР [29], хотя это активирование ЭР, по-видимому, происходит не так, как в случае с эстрогеном.

Неудачи лечения тамоксифеном приблизительно у 40% больных, из всех ЭР-положительных больных раком молочной железы, необходимость раннего повтора курса терапии и эстрогеноподобные изменения эндометрия можно отнести к частичной агонистической активности данного препарата.

В 1988 г. Wakeling и Bowler описали новый класс антиэстрогенов. Препараты этого класса включают в себя ZM182780 (прежнее название ICI182780), RU58668 и ZK164015. Во многих системах указанные вещества полностью блокировали ЭР-опосредованные эффекты, и поэтому их отнесли к классу истинных антиэстрогенов. Путь, по которому эти вещества блокируют ЭР, отличается от пути, по которому блокируют ЭР частичные антиэстрогены, такие как тамоксифен [2].

10.2.2. Механизм действия истинных антиэстрогенов. Гормон, связавшийся с ЭР, взаимодействует с эстроген-чувствительными элементами (ЭЧЭ) на промоторных участках и активирует их экспрессию. Активация ЭР запускает два трансактивационных фактора (AF1 и AF2), которые действуют вместе как агонисты. Тамоксифен блокирует AF2 функцию ЭР, но активирует AF1. Истинные антиэстрогены блокируют и AF1, и AF2, хотя полностью предотвращают трансактивацию генов, которые находятся под контролем ЭЧЭ. Разные эффекты, вызываемые AF1, можно объяснить различием ответов, колеблющихся в пределах от антагонизма до частичного агонизма, такого как у тамоксифена.

Некоторое число экспериментов, выполнявшихся на моделях тканевых культур и на животных, показали, что ЭР могут быть активированы факторами роста — сигнальными посредниками трансдукции. Эстрадиол-индуцированная активность ЭР усиливается при добавлении факторов роста, и это служит доказательством того, что даже без лиганда ЭР могут быть активированы факторами роста. Стимулирующие эффекты факторов роста, таких как эпидермальные факторы роста и инсулиноподобный фактор роста-1, активируют функцию фактора AF1. Таким образом, антиэстрогены, такие как тамоксифен, которые не блокируют AF1, неэффективны в блокировании эффектов этих факторов роста. В отличие от них большинство факторов роста являются посредниками активации ЭР и могут быть полностью заблокированы истинными антиэстрогенами. Как будет показано ниже данный факт подчеркивает чёткие различия между действием частичных и истинных антиэстрогенов.

Для объяснения молекулярных механизмов, используемых чистыми антиэстрогенами для устранения всех ЭР-опосредованных эффектов, были высказаны следующие предположения. Во-первых, ЭР, связавшийся с истинным антиэстрогеном, способен связаться с ЭРЭ, но полностью блокирует функции факторов AF1 и AF2. Во-вторых, истинные антиэстрогены могут ослаблять взаимодействие рецептора с ЭРЭ. Эта идея была предложена Fawell и др. и не опровергнута до настоящего времени. В-третьих, чистые антиэстрогены могут вызывать дестабилизацию ЭР. Такой эффект ЭР был описан для некоторых тканей, включая клетки рака молочной железы у человека. Дестабилизирующий эффект свойственен только истинным антиэстрогенам, так как не наблюдается после истощения запасов эстрогена. Применение же частичных антиэстрогенов может даже повышать уровень ЭР [29].

Возможный механизм, позволяющий объяснить дестабилизирующий эффект ЭР, был предложен Dauvois и др. Ядерные ЭР, связавшиеся с истинным антиэстрогеном, диффундируют из ядра в цитоплазму и претерпевают конформационные изменения. Данные конформационные изменения предотвращают перемещение рецептора в ядро. В результате цитоплазматические ЭР под воздействием протеаз подвергаются деградации [2].

Известно, что ЭР могут функционировать и иным способом. В дополнение к их способности выступать в качестве транскрипционных активаторов ЭРЭ классическим

способом, они могут напрямую связываются с транскрипционными факторами NF-$\varkappa$B и C/EBPβ, подавляющими экспрессию генов ИЛ-6 (Stein и Yang). При этом такая ЭР-опосредованная трансляция также индуцируется антиэстрогенами, такими как тамоксифен, но не истинными антиэстрогенами, такими как RU58668.

Ещё одним примером ЭР-опосредованной транскрипционной регуляции является неклассическая активация экспрессии фактором роста β_3. В ткани с повышенной экспрессией ЭР антиэстрогены ралоксифен, тамоксифен и ZM164384 проявляют эстрогенную активность в трансформации промотора фактора роста β_3. Эти результаты показывают, что истинный антиэстроген ZM164384 может мгновенно вызвать ЭРЭ-независимую активность ЭР. Недостаточная дестабилизация ЭР в присутствии ZM164384 была предложена в качестве объяснения этого феномена [2].

Истинные антиэстрогены высоко эффективны и не проявляют агонистической активности против растущей опухоли. Они блокируют растущий тамоксифенустойчивый рак, показывая преимущества истинных антиэстрогенов над тамоксифеном [29]. Первые клинические испытания доказали, что истинные антиэстрогены могут индуцировать ремиссию опухоли у пациентов, которые устойчивы к тамоксифену.

10.2.3. Механизм действия тамоксифена. Более двадцати лет тому назад появление в клинической практике первого из препаратов антиэстрогенового ряда — тамоксифена позволило не только улучшить качество жизни больных раком молочной железы в менопаузе, но и значительно увеличить продолжительность их жизни.

Показано, что тамоксифен действует на опухолевые клетки через эстрогенные и гестагенные рецепторы, а также может влиять на активность факторов роста:

— стимулируя продукцию паракринных желёз, которые усиливают ингибирующее влияние β-фактора роста стромальных фибробластов на опухоль;

— снижая продукцию трансформирующего фактора роста α, стимулирующего рост опухоли;

— подавляя синтез инсулиноподобного фактора роста (ИПФР-1), усиливающего рост опухолевых клеток;

— ингибируя ангиогенез и ускоряя апоптоз.

Таким образом, можно сделать заключение, что противоопухолевый эффект препарата при опухолях, не содержащих эстрогенных рецепторов, получается именно за счёт его воздействия на факторы роста [22]. Именно на факте наличия эстрогенных рецепторов в опухоли построена теория прогнозирования ответа на эндокринную терапию клеток рака молочной железы. У пациенток, не имеющих рецепторов эстрогена в опухоли, шанс добиться успеха равен примерно 10% [23].

Существуют данные о том, что тамоксифен действует на модификатор биологического ответа, усиливая активность естественных киллеров. Возможно, это стимулирующее действие может отчасти нейтрализовать иммуносупрессивные эффекты цитотоксической химиотерапии.

Нолвадекс (торговое название препарата, содержащего тамоксифен) изменяет нормальный клеточный ответ на присутствие эстрадиола, конкурируя с гормоном за связывание с ЭР [24]. В результате образования комплекса эстрадиол–рецептор не происходит и, естественно, клетка не получает сигнала к делению.

Факторы роста влияют на клетки, вступившие в клеточный цикл деления. Для их перехода из G_0 в следующую фазу клеточного цикла необходимо присутствие тромбоцитарного фактора роста и фактора роста фибробластов. Продвижение компетентной клетки через G_1-фазу (длительность которой лимитирует скорость пролиферации клеток) происходит под влиянием факторов прогрессии: инсулиноподобного и эпидермального, а также трансформирующего факторов роста. Следовательно, раз-

витие клетки происходит при синергическом действии факторов роста в определённой последовательности и сочетании.

Предполагается, что действие нолвадекса на клетки, развивающиеся под влиянием факторов роста, происходит через рецепторы эстрогена.

Недавно был продемонстрирован аналогичный его эффект и в клетках без эстрогенных рецепторов. *In vivo* получены доказательства нового механизма действия нолвадекса [25]. Оказалось, что в культурах фетальных фибробластов, в которых отсутствует механизм регуляции, опосредованный эстрогенными рецепторами, в ответ на присутствие нолвадекса в 30 раз возрастает продукция ингибирующего фактора роста β [26]. Эти данные свидетельствуют о способности нолвадекса действовать как на рецепторположительные, так и на рецепторотрицательные клетки.

Показано, что часть клеток рака молочной железы человека под действием нолвадекса погибает по неспецифическому цитотоксическому механизму. Идентифицировано несколько биохимических моделей, которые могут привести к этому. Например, связывание факторов роста с мембранным рецептором приводит к активации метаболизма мембранных фосфолипидов. Это вызывает увеличение продукции вторичных мессенджеров — диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата, который активирует протеинкиназу С (ПКС) и увеличивает концентрацию кальция внутри клетки. Протеинкиназа С и внутриклеточный кальций могут действовать независимо друг от друга или синергически в ускорении репликации клеток. В микромолярных концентрациях *in vitro* нолвадекс ингибирует ПКС и кальмодулин, что приводит к торможению клеточного роста *in vivo*.

Существуют данные о действии нолвадекса на модификатор биологического ответа путём увеличения активности естественных киллеров [27]. Через месяц лечения активность киллерных клеток возрастает более чем в два раза, а при отмене препарата отмечается быстрое падение этой активности, почти до исходного уровня.

Очевидно, действие нолвадекса на механизмы естественной иммунологической защиты играют важную роль в увеличении безрецидивной и общей выживаемости, независимо от статуса эстрогенных рецепторов. Возможно, это стимулирующее действие может отчасти нейтрализовать иммуносупрессивные эффекты цитотоксической химиотерапии.

Таким образом, накопленные в течение многих лет данные значительно расширяют наши представления о механизме действия нолвадекса (тамоксифена). От изначального представления о блокировании рецепторов эстрогена в опухоли и, тем самым, о прекращении опухолевого роста мы приходим к представлению об участии в нём факторов роста и их взаимодействии с опухолевой клеткой, как при наличии эстрогенных рецепторов в клетке, так и при их отсутствии.

10.2.4. Фармакокинетика тамоксифена. В исследованиях, проведённых на животных и на человеке с использованием меченого нолвадекса, выявлено, что он хорошо всасывается и подвергается метаболизму после приёма внутрь. Препарат в основном выводится с калом в конъюгированном виде и в виде неидентифицированных метаболитов, и только незначительная его часть выделяется неизменённой.

Период полувыведения нолвадекса составляет около 7 сут. Постоянная концентрация препарата — приблизительно 300 мг/мл — достигается примерно через 4 недели приёма в дозе 40 мг в сутки. Сывороточные концентрации зависят от дозы. На стадии постоянной концентрации основным циркулирующим метаболитом нолвадекса является М-дезметилтамоксифен; он составляет около 50% его дозы. Концентрация нолвадекса и его метаболитов в опухоли пропорциональна сывороточным концентрациям [28]. Фармакокинетические свойства препарата позволили обосновать очень удобный режим его приёма — один раз в сутки

10.3. Антиандрогены

Антиандрогены — препараты, блокирующию активность адрогенных гормонов, — необходимы для клинической медицины, в первую очередь для лечения андрогензависимых опухолей, среди которых наиболее часто встречается рак предстательной железы (РПЖ). РПЖ — это гормонально зависимая опухоль, на которую в первую очередь влияет тестостерон. В клетках предстательной железы тестостерон превращается в функционально активный андроген — дигидротестостерон (ДГТ). Чтобы понять механизм действия противоопухолевой терапии при раке предстательной железы, важно уяснить взаимодействие гормонов в эндокринной системе мужчины.

Семенники продуцируют около 95% всех андрогенов в виде тестостерона. В семенниках он продуцируется клетками Лейдига в ответ на стимуляцию лютеинизирующим гормоном (ЛГ), который секретируется аденогипофизом в ответ на высвобождение рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона гипоталамуса. Соотношение гормонов определяется состоянием гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы.

Механизм отрицательной обратной связи заключается в том, что при снижении уровней тестостерона гипоталамус высвобождает ЛГРГ, который, в свою очередь, стимулирует секрецию ЛГ, и, в итоге, повышается секреция тестостерона. Механизм обратной связи приводит к возрастанию концентрации тестостерона, при этом уменьшаются выбросы ЛГРГ гипоталамусом.

Надпочечники — это второй источник, на долю которого приходится выработка примерно 5% всех андрогенов. Под стимулирующим действием адренокортикотропного гормона (АКТГ) надпочечники секретируют андрогены — андростендион и дегидроэпиандростерон, которые превращаются в тестостерон в периферических тканях и в предстательной железе.

Большая доля циркулирующего в крови тестостерона связана глобулином, связывающим половые гормоны (ГСПГ), и альбумином. Небольшая часть (2–3%) циркулирующего тестостерона не связана и, как считается, является функционально-активной формой тестостерона, который проникает в ткани предстательной железы. Свободный тестостерон пересекает мембрану клетки предстательной железы, а затем в цитозоле подвергается метаболической трансформации. Фермент стероид-5-α-редуктаза катализирует восстановление тестостерона в 5-α-дегидротестостерон (ДГТ) [1].

Внутриклеточный ДГТ — это гормон, по андрогенной активности в 2,5 раза превосходящий тестостерон. Он связывается с рецептором внутри клеточного ядра, «отыскивает» нужный участок связывания с хроматином и активирует клеточные функции [1]. Несмотря на то что кастрация (орхидэктомия или применение аналогов ЛГРГ) вызывают 95%-е снижение уровня тестостерона в сыворотке, уровень ДГТ в тканях предстательной железы изменяется меньше. Концентрация андрогенов в клетках злокачественной опухоли предстательной железы после кастрации на 30–40% выше, чем в нормальных.

Таким образом, у мужчин имеется два источника андрогенов: семенники и надпочечники. Существуют данные, что андрогены надпочечников способны стимулировать опухоль предстательной железы после падения концентрации тестостерона в результате хирургической или медикаментозной кастрации. В надпочечниках тестостерон образуется в процессе прямого синтеза, кроме того, тестостерон образуется в периферических тканях из других гормонов надпочечников — андростендиона и дегидроэпиандростерона и их сульфатов. Тестостерон, синтезируемый в клетках надпочечников, превращается в ДГТ в клетках предстательной железы и, следо-

вательно, продолжает стимулировать рост рака предстательной железы. Результаты экспериментальных исследований и исследований с участием больных раком предстательной железы показывают, что ингибирование андрогенов надпочечников вместе с кастрацией (хирургической или медикаментозной) улучшает частоту ответа на лечение и выживаемость по сравнению с одной только кастрацией [31].

На сегодняшний момент эта злокачественная опухоль стоит на втором месте по причине смерти от рака у мужчин. В то время как опухоли, ограниченные органом, могут успешно лечиться с применением хирургии, прогрессирующая или метастазирующая карцинома простаты может быть вылечена только при помощи мягкой гормональной терапии. Эта терапия основана на данных ещё 1941 г. по уменьшению уровня тестостерона в крови путём подавления его синтеза в яичках и коре надпочечников, что приводит к облегчению у больных раком простаты. На данный момент существуют следующие варианты и методы андрогенной блокады:

— билатеральная орхидэктомия,
— эстрогенная терапия,
— «чистые» антиандрогены,
— антиандрогены двойного действия,
— агонисты (аналоги) ЛГРГ,
— орхидэктомия + антиандрогены,
— антиандрогены + эстрогены,
— агонисты (аналоги) ЛГРГ + антиандрогены.

Идеальная терапия рака предстательной железы включает блокаду действия андрогенов на клеточном уровне предстательной железы, что реализуется снижением связывания дигидротестостерона с ядерным рецептором при конкурентном торможении или снижении концентрации цитоплазматического рецептора андрогенов. Орхидэктомия является эффективным методом снижения в крови основного биологически активного андрогена — тестостерона, но не оказывает действия на продукцию адреналь ных андрогенов.

Как известно, обычно в момент установления диагноза рака предстательной железы уже невозможно произвести радикальную операцию (80–90% случаев) и лечение носит характер паллиативного. Как правило, рак простаты представляет собой андрогензависимый процесс, и примерно у 70% больных этим заболеванием в результате эндокринной терапии имеет место улучшение их состояния и качества жизни. Поэтому общий принцип такого лечения состоит в противодействии (депривации) андрогенной стимуляции опухолевых клеток предстательной железы. Достичь этого можно или в результате удаления семенников, продуцирующих андрогены (операция орхидэктомии), или с помощью лекарственных средств, блокирующих выработку андрогенов и/или взаимодействие андрогенов с их рецепторами в клетках-мишенях. К таким препаратам относятся эстрогены, чистые антиандрогены, антиандрогены двойного действия, ЛГРГ-агонисты, гестагены, ингибиторы биосинтеза стероидов, а также их комбинации: ЛГРГ-агонисты + антиандрогены, ЛГРГ-агонисты + ингибиторы синтеза стероидов, орхидэктомия + антиандрогены, антиандрогены + эстрогены.

Примерно 90% всех андрогенов в организме вырабатывается в семенниках (контролируется системой ЛГРГ — ЛГ) и примерно 10% — в надпочечниках (контролируется АКТГ).

В результате орхидэктомии исчезает источник более 90% от всех андрогенов в организме и увеличивается уровень ЛГ. К отрицательным последствиям такой операции относят психологическую нагрузку и появление приливов «жара», аналогично тем, которые встречаются у женщин в период постменопаузы.

Эффекты эстрогенов обусловлены взаимодействием с рецепторами ЦНС, которые регулируют секрецию ЛГРГ. При этом снижается секреция ЛГ и падает уровень те-

стостерона до уровня, который наблюдается после кастрации. Выработка андрогенов надпочечниками продолжается. Хотя препараты эстрогенов долгие годы относили к классическим средствам терапии рака простаты, им присущ ряд неприятных побочных эффектов. Болезненная гинекомастия, тошнота и рвота при их использовании встречаются довольно часто. Кроме того, эстрогены могут вызывать тромбоз глубоких вен. Поэтому в настоящее время эстрогенные препараты уступили место другим средствам с аналогичной терапевтической эффективностью, но с менее выраженными побочными эффектами.

Механизм действия гестагенов на выработку андрогенов сходен с действием эстрогенов. Вследствие своего центрального действия гестагены ингибируют секрецию ЛГ и выработку тестостерона в семенниках, не влияя на биосинтез андрогенов в надпочечниках. Хотя приём гестагенов лучше переносится, чем приём эстрогенов, их терапевтическая эффективность ниже по сравнению с диэтилстильбэстролом или ципротерона ацетатом.

Все антиандрогены ингибируют действие андрогенов на органы-мишени путём конкуренции с ними за связывание с рецепторами. Комплекс антиандроген–рецептор не способен специфично связываться с хроматином и инициировать синтез специфичных андрогензависимых белков в клетке. Среди антиандрогенов выделяют вещества с чистым или истинным антиандрогенным эффектом (они обладают способностью блокировать рецепторы андрогенов) и вещества с двойным действием (обладают, наряду со способностью блокировать андрогенные рецепторы, прогестагенной и антигонадотропной активностью).

10.3.1. Чистые антиандрогены. Эти вещества (флутамид, бикалутамид) блокируют рецепторы андрогенов как в простате, так и в гипоталамусе. В связи с этим происходит стимуляция оси гипоталамус–гипофиз–семенники и, как следствие, гиперплазия клеток Лейдига. У мужчин при этом имеет место повышение уровня тестостерона и эстрадиола в крови. Эстрадиол образуется из тестостерона путём ароматизации и вызывает гинекомастию. Поскольку чистые антиандрогены ингибируют андрогенные рецепторы по конкурентному механизму, повышение уровня эндогенного тестостерона со временем может полностью или частично снизить их антиандрогенный эффект. Поэтому с помощью чистых антиандрогенов нельзя достичь полной нейтрализации трофического действия эндогенных андрогенов на простату.

10.3.2. Антиандрогены двойного действия. Эти препараты обладают, в дополнение к антиандрогенным свойствам, антигонадотропными эффектами. Типичный представитель таких препаратов — ципротерона ацетат (ЦПА). По сравнению с чистыми антиандрогенами ЦПА вызывает совсем другие гормональные сдвиги.

Уникальность ЦПА состоит в одновременном наличии у одного вещества способности воздействовать на два основных принципа подавления андрогенной активности: снижение концентрации андрогенов в крови и ингибирование действия андрогенов на уровне рецепторов простаты.

Так же как и в случае эстрогенной терапии, ЦПА не полностью подавляет синтез андрогенов, но, в отличие от эстрогенов, ЦПА оказывает антиандрогенный эффект на клеточном уровне, что в конечном итоге обеспечивает более выраженное подавление андрогенных эффектов. В большом количестве фармакологических исследований показано, что эффекты ЦПА сравнимы с хирургической кастрацией. В частности, это справедливо в отношении массы простаты у крыс, мышей и собак. В экспериментах на собаках установлено, что ЦПА вызывает такое же снижение пролиферативной активности (определение по уровню ДНК) и секреторной активности (снижение активности кислой фосфатазы, аминопептидазы и уровня цинка) в простате, как и орхид-

эктомия. Антиандрогенное действие ЦПА проявляется во всех андрогензависимых органах, например в ингибировании сперматогенеза в семенниках. У человека после введения ЦПА в течение года имеют место отчётливая атрофия тубулярных клеток семенников канальцев и полное исчезновение мейозов. Проведённые эксперименты показали, что у человека доза ЦПА, при которой происходит сравнимое с кастрацией угнетение андрогензависимых органов, составляет 200 мг/день (перорально).

Первое сообщение о клиническом опыте применения ЦПА (100 мг) было опубликовано в 1966 г. У больных с метастазами и болями в спине лечение с помощью Андрокура привело к исчезновению болей и повышению массы тела. В другом исследовании Смит и др. (1973) обнаружили, что у больных раком простаты выраженный терапевтический эффект Андрокура имеет место у 18 больных из 28. Интересно отметить, что у 6 больных из этих 18 предшествующее лечение диэтилстильбэстролом было неэффективным. При проведении обширного открытого исследования использования ЦПА у 500 пациентов в течение более чем 12 лет выявлено, что выживаемость составляет 64,4%. Интересно отметить, что пациенты, которые были не чувствительны к терапии ЦПА, также оказались не чувствительными и к последующей орхиэктомии.

При проведении рандомизированного исследования (III фаза) в 12 клинических центрах по сравнению эффектов ЦПА (300 мг в неделю внутримышечно) и эстрадиола ундециалата (100 мг в месяц внутримышечно) была показана сходная эффективность эндокринной терапии у двух групп больных, но ЦПА вызывал значительно меньше побочных эффектов, особенно сердечно-сосудистых и, как и ожидалось, случаев гинекомастии.

Под руководством Европейской организации исследований и терапии рака было проведено сравнительное исследование эффективности ЦПА, диэтилстильбэстрола и медроксипроргестона ацетата у 210 больных раком простаты III и IV стадии. Согласно полученным результатам, ЦПА имеет сходные терапевтические эффекты с диэтилстильбэстролом в отношении прогрессирования заболевания и выживаемости. В то же время эффективность медроксипрогестерона ацепоната была заметно ниже. При сравнении частоты появления гинекомастии у этих больных показано, что она была наибольшей при лечении диэтилстильбэстролом и редко встречалась у больных, лечившихся ЦПА или медроксопрогестерона ацетатом. Особенно серьёзным побочным действием диэтилстильбэстрола было влияние на сердечно-сосудистую систему: артериальная гипертензия, тромбоэмболии или инфаркт миокарда у больных, лечившихся ЦПА, медроксипрогестороном ацетатом и диэтилстильбэстролом, встречались в 9,6%, 18,3% и 34,3% случаев соответственно. Объяснением такого различия в действии эстрогенов и ЦПА на сердечно-сосудистую систему служат данные о том, что эстрогены снижают уровень антитромбина III (ингибирует внутрисосудистое свёртывание крови), фибринолитическую активность, а ЦПА действует противоположным образом.

10.3.3. Аналоги гормона, высвобождающего гонадотропные гормоны (ЛГРГ-агонисты). Терапевтическая эффективность этих препаратов обусловлена тем, что при длительной стимуляции ЛГРГ-агонистов гипофиза на поверхности клеток происходит исчезновение рецепторов для них (даун-регуляция), т. е. клетки гипофиза становятся нечувствительными. Однако такая десенсетизация происходит не одномоментно, а требует некоторого времени (2-х недель). Более того, первоначально имеют место стимулирующее действие ЛГРГ-агонистов на гипофиз, увеличение выработки гонадотропинов и, как следствие, повышение уровня тестостерона в крови. Затем уровень тестостерона падает до уровня, какой имеет место при кастрации (выработка андрогенов в надпочечниках сохраняется).

Поэтому в первое время после начала лечения ЛГРГ-агонистами увеличивается стимулирующее действие андрогенов на опухоль и наблюдается так называемая «вспышка» заболевания, которая у 10–30% больных сопровождается повышением болей в области метастазов. К другим побочным эффектам ЛГРГ-агонистов, так же как орхидэктомии и чистых антиандрогенов, относятся приливы жара, которые опосредованы гипоталамическими механизмами. В норме половые стероидные гормоны, взаимодействуя с рецепторами гипоталамуса, вызывают высвобождение опиоидных пептидов, которые оказывают ингибирующее действие на норадренергические нейроны. Норадреналин не только стимулирует высвобождение ЛГРГ, но и стимулирует центр терморегуляции, который расположен вблизи нейронов, ответственных за синтез и высвобождение ЛГРГ. Поэтому при снижении уровня половых стероидов (в результате кастрации, действия ЛГРГ-агонистов) или при лечении чистыми антагонистами андрогенов исчезает стимулирующее действие андрогенов на опиоиды гипоталамуса. Вследствие этого высвобождается повышенное количество норадреналина, который нарушает функцию центра терморегуляции.

10.3.4. Клиническое применение антиандрогенов. Уникальность ЦПА заключается в том, что он обладает центральной гестагенной активностью и поэтому не вызывает приливов жара. Более того, ЦПА ингибирует их появление после орхидэктомии или лечения ЛГРГ-агонистами. Именно в этом состоит преимущество ЦПА по сравнению со всеми другими видами эндокринной терапии, включая и чистые антиандрогены, андрогензависимого неоперабельного рака простаты.

В настоящее время ингибиторы биосинтеза стероидов (аминоглутетимид, кетоконазол) не нашли широкого применения для лечения рака простаты, так как часто вызывают тяжёлые побочные эффекты.

Поскольку орхидэктомия и терапия ЛГРГ-агонистами не обеспечивает полное выключение биосинтеза андрогенов (этот процесс продолжается в надпочечниках) рекомендуется такие виды лечения проводить одновременно с введением антиандрогенов либо эстрогенов.

После орхидэктомии доза антиандрогена, которая необходима для ингибирования действия андрогенов, вырабатываемых в надпочечниках, намного меньше, чем у пациентов без орхидэктомии. Для блокирования эффектов андрогенов можно использовать как чистые антиандрогены, так и ЦПА. Однако применение ЦПА после орхидэктомии предпочтительнее, так как в этом случае одновременно будут подавляться приливы жара, имеющие место при орхидэктомии.

Поскольку эффекты надпочечниковых андрогенов эстрогенами не подавляются, их использование при орхидэктомии не считается целесообразным.

После даун-регуляции рецепторов для ЛГРГ применение антиандрогенов осуществляется по схеме, аналогичной их применению у пациентов с орхидэктомией. В этом случае ЦПА также имеет преимущество по сравнению с чистыми антиандрогенами. В то же время в начальный период введения ЛГРГ именно ЦПА следует использовать для исключения индукции синтеза тестостерона и возникновения «вспышки» заболевания. Чистые антиандрогены (флутамид) не ингибируют стимулирующее действие ЛГРГ-агонистов на секрецию ЛГ в начале терапии [32].

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что препараты эстрогенов вследствие их серьёзных побочных эффектов (в первую очередь, со стороны сердечно-сосудистой системы) использовать для лечения рака простаты нецелесообразно.

10.3.5. Преимущества антиандрогенов двойного действия. Только антиандрогенные препараты двойного действия типа ЦПА подходят для монотерапии

у больных без орхидэктомии. После кастрации можно использовать оба типа антиандрогенов.

ЦПА по сравнению с чистыми антиандрогенами имеет преимущество при проведении комбинированной терапии с ЛГРГ-агонистами в начальной фазе лечения, потому что он ингибирует повышение уровня тестостерона. Оба типа антиандрогенов в равной степени показаны при их комбинации с ЛГРГ-агонистами после даунрегуляции рецепторов гипофиза.

Приливы жара отмечаются при монотерапии ЛГРГ-агонистами или при комбинированной терапии ЛГРГ-агонистами и чистыми антиандрогенами, а также при орхидэктомии, но их нет при проведении монотерапии с использованием ЦПА. Более того, ЦПА ингибирует появление приливов жара у больных при их лечении ЛГРГ-агонистами или после орхидэктомии.

10.3.6. Фармакокинетика ципротерона ацетата. При пероральном введении ципротерона ацетат полностью всасывается в кровь и при первичном прохождении через печень практически не подвергается метаболизму: его абсолютная биодоступность 88% (от всей дозы). Максимальная концентрация ципротерона ацетата в крови после его перорального введения в дозе 50 мг составляет примерно 140 нг/мл, наблюдается через 3–4 ч. Затем происходит снижение концентрации ЦПА в крови в течение 24–120 ч с временем $t_{1/2}$ в последней стадии элиминации $43{,}9 \pm 12{,}8$ ч. Общий клиренс элиминации ЦПА $3{,}5 \pm 1{,}5$ мл/мин/кг. Главные пути метаболизма ЦПА — гидроксилирование и образование конъюгатов. Основной метаболит ЦПА в плазме человека представляет собой 15-β-гидроксипроизводное. В плазме крови ЦПА в основном связывается с сывороточным альбумином, и примерно 3,5–4% находится в свободном виде. Заметного взаимодействия ЦПА с глобулинами, связывающими половые стероиды, не обнаружено. Примерно 30% его метаболитов выделяется с мочой и 70% — с жёлчью. В связи с длительным характером элиминации ЦПА при его ежедневном приёме следует ожидать аккумуляции препарата с фактором, примерно равным 3. Постоянный уровень элиминации ЦПА устанавливается к 8–10-му дню после начала лечения. Такой характер фармакокинетики ЦПА способствует формированию постоянной концентрации действующего вещества в органах-мишенях. Изучение дозовой зависимости действия ципротерона ацетата позволило рекомендовать его дозу 50 мг дважды в день (при орхидэктомии) и возможность её увеличения до 100 мг 3 раза в день (без орхидэктомии).

После внутримышечного введения ЦПА в лекарственной форме с пролонгированным действием (Андрокур-Депо) наблюдаются медленное высвобождение ЦПА и достижение максимальной его концентрации в сыворотке (180 ± 54 нг/мл) через 2–3 дня. Затем концентрация ЦПА в сыворотке снижается с $t_{1/2} = 4 \pm 1{,}1$ дня. Общий клиренс ЦПА из сыворотки при этом равен $2{,}8 \pm 1{,}4$ мл/мин/кг. Вследствие длительности конечной фазы элиминации ЦПА при его введении каждые 7 дней при повторных введениях следует ожидать аккумуляции ЦПА. Равновесие между высвобождением из депо и элиминацией ЦПА следует ожидать через 5 недель. Характер метаболизма ЦПА после его перорального и внутримышечного введения одинаков.

С учётом параметров фармакокинетики ЦПА при разных путях его введения, можно сделать вывод, что достижение примерно одинакового уровня активного вещества в крови при внутримышечном введении депонированной формы возможно при общей дозе ЦПА, которая более чем в 2 раза меньше, чем при его пероральном введении. Поэтому в тех случаях, когда ЦПА в больших дозах оказывает нежелательное действие на печень, использование его депонированной формы предпочтительнее.

В настоящее время для лечения неоперабельной формы рака простаты существуют разные способы эндокринной терапии, а также проведение операции орхидэктомии. Следует отметить, что выбор терапии определяется всегда индивидуальными особенностями пациента, но существуют общие принципы, обусловленные характером фармакологических свойств того или иного препарата. Если желательно проведение монотерапии, то предпочтительнее использовать препараты, содержащие ЦПА, Андрокур или Андрокур-Депо, поскольку благодаря двойному действию можно добиться как блокирования действия эндогенных андрогенов, так и снижения выработки андрогенов в основном месте их биосинтеза — семенниках. С нашей точки зрения, замена ЦПА на чистые антиандрогены (флутамид, нилутамид, бикалутамид) может быть оправдана только при индивидуальной нечувствительности к ЦПА. Чистые антиандрогены синтезированы позднее, чем был внедрён ЦПА; они имеют нестероидную структуру, и бытует мнение, что они имеют преимущество по сравнению с ЦПА именно вследствие их негормональной природы. Однако, действуя как чистые антиандрогены, они блокируют андрогенные рецепторы не только на периферии, но и в ЦНС. Последнее приводит к значительному повышению уровня ряда гормонов, в частности, один из последних препаратов, относящихся к нестероидным антиандрогенам, — бикулатамид повышает уровень ЛГ более чем на 100%, общего и свободного тестостерона на 59% и 51% соответственно, а также эстрадиола на 65%. Эти данные свидетельствуют о том, что нестероидные антиандрогены обладают очень выраженными эффектами на эндокринную систему, причём повышение уровня тестостерона с точки зрения развития андрогензависимого опухолевого процесса крайне нежелательно. Однако это положительно только с точки зрения сохранения либидо и сексуальной активности. В то же время стероидный препарат ЦПА, как антиандроген двойного действия, снижает выработку тестостерона, ингибируя секрецию ЛГ, что усиливает подавление роста андрогензависимых опухолей.

Проведение комбинированной терапии агонистами ЛГРГ и антиандрогенами ЦПА по сравнению с чистыми антиандрогенами также имеет преимущество, так как позволяет подавлять вспышки опухолевого процесса и возникновение приливов жара.

Таким образом, ЦПА в лекарственных формах Андрокур и Андрокур-Депо остаётся препаратом выбора среди антиандрогенов при проведении монотерапии или комбинированной терапии неоперабельного андрогензависимого рака простаты.

10.4. Заключение

Одно из основных применений антигормонов — это лечение онкологических заболеваний. Смертность от онкологических заболеваний одна из самых высоких. В связи с улучшением диагностики возможно более раннее выявление рака и проведение медикаментозного, а не хирургического лечения. Очевидно, что хирургические вмешательства переносятся тяжелее медикаментозного лечения, в том числе в психологическом аспекте. В связи с этим изучение механизмов действия и разработка новых антигормонов занимает важное место в современной медицине.

К сожалению, применение антигормонов не приводит к полному излечению опухоли. Как правило, они обеспечивают длительную ремиссию. Вследствие этого пациенты нуждаются в достаточно длительном приёме препаратов и в больших дозах. Поэтому дальнейшие разработки новых антигормонов должны быть направлены на более прицельное действие антигормонов против клеток злокачественных новообразований для того, чтобы уменьшить побочное действие на здоровые органы и ткани. Нельзя не затронуть и экономическую сторону данной проблемы. Длительный приём,

порой пожизненный, требует больших экономических затрат, поэтому уменьшение стоимости сделает эти лекарственные средства более доступными.

На настоящий момент перспективным считается проведение комбинированной блокады половых гормонов. Используют комбинации антигормона (например, тамоксифена для лечения РМЖ или ципротерона ацетата для лечения РПЖ) с агонистами рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона. Примером такого агониста является золадекс. Ежемесячное внутримышечное или подкожное введение гарантирует надёжность «химической» кастрации. А применение ЛГРГ снижает уровень гормонов в крови до посткастрационного уровня. Использование ЛГРГ в сочетании с антигормонами приводит к минимальным физиологическим и биологическим побочным эффектам, характерным для кастрации.

Таким образом, изучение механизмов взаимодействия антигормонов с организмом позволит в скором времени создать более совершенные препараты, которые позволят улучшать здоровье и качество жизни людей, больных опухолевыми заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 10

1. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л.* Рецепторы физиологически активных веществ. — М. Медицина, 1987. С. 323–347.
2. *Fuhrmann U., Parczyk K., Klotzbucher M. et al.* Recent developments in molecular action of antihormones // J. Mol. Med. 1998. V. 76. P. 512–524.
3. *Tsai M.-J., O'Malley B. W.* Molecular mechanism of action of steroid/thyroid hormone receptor superfamily members // Ann. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 451–486.
4. *Beato M., Hurrlich P., Schutz G.* Steroid hormone receptor: many actors in search of plot // Cell. 1995. V. 83. P. 851–857.
5. *Gagne D., Pons M., Philibert D.* RU 38486: a potent antiglucocorticoid in vitro and in vivo // J. Steroid. Biochem. 1985. V. 23. P. 247–251.
6. *Kastner P., Krust A., Turcotte B. et al.* Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcript encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1603–1614.
7. *Conneely O.M., Maxwell B.L., Toft D.O. et al.* The A and B forms of the chiken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 149. P. 493–501.
8. *Tung L., Mohamed M.K., Hoeffler J.P. et al.* Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors // Mol. Endocrinol. 1993. V. 7. P. 1256–1265.
9. *Vegeto E., Shahbaz M.M., Wen D.X. et al.* Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function // Mol. Endocrinol. 1993. V. 7. P. 1244–1255.
10. *Allan G.F., Tsai S.Y., Tsai M.-J., O'Malley B.W.* Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 15. P. 11750–11754.
11. *Clemm D.L., Macy B.L., Santiso-Mere D., McDonnell D.P.* Defenition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone reseptor // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 1995. V. 53. P. 487–495.
12. *Vegeto E., Allan G.F., Schrader W.T. et al.* The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone reseptor // Cell. 1992. V. 15. P. 703–713.
13. *Kettel L.M., Murphy A.A., Morales A.J. et al.* Treatment of endometriosis with the antiprogesterone mifepristone (RU486) // Fertil. Steril. 1996. V. 65. P. 23–28.
14. *Jeng M.H., Landan-Fahey S.M., Jordan V.C.* Estrogenic action of RU486 in hormone-responsive human breast cancer cells // Endocrinology. 1993. V. 132. P. 2622–2630.
15. *Webster D., Penney G.C., Templeton A.* A comparison of 600, 400 and 200 mg mifepristone prior to second trimester abortion with the prostaglandin misoprostol // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1996. V. 103. P. 706–709.
16. *Webb A.* Emergency Contraception // BMJ. 2003. V. 12. P. 775–776.
17. *Grunberg S.M., Weiss M.H., Spitz I.M. et al.* Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogesterone agent mifepristone // J. Neurosurg. 1991. V. 74. P. 861–866.
18. *Возный Э.К., Добровольская Н.Ю., Быков Ю.М.* Возможности адъювантной эндокринной терапии рака молочной железы // Маммология. 2008. № 3. С. 54–57.
19. *Soudik E.J.* Breast cancer trends: incidence, mortality and survival // Cancer. 1994. V. 74. P. 995–999.

20. *Day N.E.* Screening for breast cancer // Br. Med. Bull. 1991. V. 47. P. 400.
21. *McGuire W.L.* Steroid receptors in human breast cancer // Cancer Res. 1978. V. 38. P. 4298–4291.
22. *Burke W., Daly M., Garber J. et al.* Recommendations for follow-up care of individuals with the inherited predisposition to cancer // JAMA. 1997 V. 277. P. 997–1003.
23. *Rutqvist L.E., Cedermark B., Glas U. et al.* The Stockholm trial on adjuvant tamoxifen in early breast cancer. Correlation between estrogen receptor level and treatment effect // Breast Cancer Research and Treatment. 1987. V. 10. P. 255–266.
24. *Wakeling A.E., Waleaccia B., Newboult T., Green L.R.* Non-steroidal antioestrogens–receptor binding and biological response in rat uterus, rat mammary carcinoma and human breast cancer cells // J. Steroid. Biochem. 1984. V. 20. P. 111–120.
25. *Butta A., Machennen K., Flaners K. et al.* Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment // Cancer Res. 1992. V. 52. P. 4261–4264.
26. *Baum M., Brooks M., Coletta A.* Adjuvant therapy of Cancer // Proceedings of the 6th International Conference on Adjuvant therapy of Cancer / Ed. S.E. Salmon. — Luseon, 1990. P. 48.
27. *Berry J., Green B.J., Matheson D.S.* Modulation of natural killer cell activity by tamoxifen in stage I post-menopausal breast cancer // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1987. V. 23. P. 517–520.
28. *Daniel P., Gaskell S.J., Bishop H. et al.* Determination of tamoxifen and biologically active metabolites in human breast tumours and plasma // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1981. V. 17. P. 1183–1189.
29. *Clarke R., Leonessa F., Welch J.N., Skaar T.C.* Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance // Pharmacology Reviews. 2001. V. 53. P. 25–71.
30. *Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Матвеев В.Б.* Рак предстательной железы. — М.: Медицина, 1999. — 153 с.
31. *Labrie F., Dupont A., Belanger A. et al.* New hormonal therapy in prostatic carcinoma: Combined therapy with LHRH agonist and antiandrogen // Clin. Invest. 1982. V. 5. P. 267–275.
32. *Kaisary A.V., Tyrrell C.J., Peeling W.B., Griffiths K.* Comparison of LHRH analogue (Zoladex) with orchiectomy in patients with metastatic prostatic carcinoma // Br. J. Urol. 1991. V. 67. P. 502–508.

Глава 11

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Современная химиотерапия опухолей основана на комбинированном применении (одновременном или последовательном) противоопухолевых препаратов разных химических групп. При определённых показаниях химиотерапию сочетают с хирургическим удалением опухоли и лучевой терапией. Современные противоопухолевые средства, как правило, обеспечивают лишь ремиссию заболевания. Опухолевые клетки способны становиться устойчивыми к воздействию препаратов, большинство из которых обладает малой избирательностью в отношении опухолевых клеток, и их применение сопровождается побочными эффектами. Противопоказаниями для назначения большинства противоопухолевых средств являются угнетение кроветворения, острые инфекции, нарушения функции печени, почек и др.

Работы по созданию новых противоопухолевых средств направлены на получение таких препаратов, которые при максимальном ингибирующем воздействии на опухолевые клетки минимально повреждали бы нормальные клетки и ткани организма. Поиск противоопухолевых препаратов, преимущественно цитостатиков, проводится во многом эмпирически. В связи с этим существующие средства не обладают достаточно высокой избирательностью и оказывают побочное влияние на нормальные, прежде всего интенсивно пролиферирующие, ткани. Введение в практику антигормонов (антиэстрогенов, антиандрогенов, ингибиторов ароматазы, аналогов ЛГРГ) продемонстрировало возможность успешного и в то же время относительно малотоксичного лекарственного лечения гормонозависимых опухолей.

Повышение эффективности химиотерапии опухолей идёт по разным направлениям. Главными из них являются:

— создание новых более избирательно действующих на опухолевые клетки препаратов для монохимиотерапии,

— разработка комбинированного применения двух и более препаратов (полихимиотерапия),

— оптимизация методик применения препаратов (дозирование, режим применения),

— совершенствование химиотерапии как звена или этапа комплексного и комбинированного лечения опухолей,

— применение других лекарственных средств с целью уменьшения побочного действия противоопухолевых препаратов и др.

Большое внимание уделяется механизмам действия препаратов, их фармакокинетике и фармакодинамике. На основе полученных данных разрабатываются рациональные методы использования известных препаратов и определяются пути создания новых эффективных противоопухолевых средств. Особую важность представляет

преодоление естественной и приобретённой устойчивости опухолевых клеток к цитостатикам.

Использование модификаторов биологических реакций, в первую очередь цитокинов (интерфероны, интерлейкины, колониестимулирующие факторы), расширило возможности лекарственного лечения опухолей.

Достижения молекулярной биологии, учение об апоптозе, информация о роли онкогенов и супрессоров онкогенов в контроле клеточного цикла открывают перспективы генной терапии рака. В клиническую практику впервые вошли полученные методом генной инженерии моноклональные антитела, обладающие противоопухолевым действием (ритуксимаб, трастузумаб).

11.1. Общие сведения о химиотерапии злокачественных опухолей

В клиническую практику вошло большое количество противоопухолевых средств, и за последние годы достигнуты определённые успехи в лекарственной терапии ряда опухолей. Однако не существует универсального средства, дающего лечебный эффект при всех злокачественных опухолях. Как правило, спектр действия того или иного цитостатика или гормонального препарата ограничивается несколькими, а иногда только одной опухолью или её морфологическим вариантом.

К основным принципам химиотерапии опухолей, имеющим практическое значение, относятся:

— подбор препарата соответственно спектру его противоопухолевого действия;

— выбор оптимальной дозы, режима и способа применения препарата, обеспечивающих лечебный эффект без необратимых побочных явлений;

— учёт факторов, требующих коррекции доз и режимов во избежание тяжёлых осложнений химиотерапии.

Противоопухолевые средства следует применять обычно, когда диагноз опухоли подтверждён гистологическим исследованием; лечебный эффект химиотерапии должен оцениваться по объективным показателям, которые отражают реакцию опухоли на противоопухолевый препарат; не следует применять химиотерапию, если отсутствуют условия для выявления (диагностики) и лечения возможных побочных эффектов противоопухолевого препарата.

Как правило, существует прямая зависимость между разовой и суммарной дозой препарата и терапевтическим эффектом. Однако повышение дозы препарата ограничивается проявлениями токсичности. Обычно дозы рассчитывают на единицу поверхности тела.

Для большего терапевтического эффекта препарат следует вводить в оптимальном режиме, имея в виду число введений, интервалы между введениями, продолжительность курса и интервалы между курсами.

Быстро растущие опухоли более чувствительны к химиотерапии, чем медленно растущие. Как правило, имеются различия в чувствительности метастазов и первичной опухоли. Эффективность химиотерапии обратно пропорциональна массе опухоли (числу опухолевых клеток), при которой начинают лечение. Морфологические варианты одной и той же опухоли имеют разную чувствительность к химиопрепаратам.

Предшествующая химиотерапия или облучение могут заметно изменить (понизить или реже повысить) чувствительность опухоли. Кроме того, на эффективность лечения опухолевых заболеваний влияют такие факторы, как возраст, пол, состояние иммунитета, общее состояние организма.

Общее состояние больного является важнейшим прогностическим фактором и в значительной мере определяет возможности химиотерапии. Больным в терминальном состоянии с огромной массой опухолевой ткани, значительным нарушением функции жизненно важных органов химиотерапия может принести скорее вред, чем облегчение. Исключением являются случаи, когда тяжесть состояния больного обусловлена механическим сдавлением жизненно важных органов опухолью, высокочувствительной к химиотерапевтическим воздействиям.

По способу применения (путям введения) противоопухолевых препаратов различают системную, регионарную и локальную химиотерапию.

К системной химиотерапии опухолей относится введение препаратов внутрь, подкожно, внутривенно, внутримышечно и ректально, рассчитанное на общий (резорбтивный) противоопухолевый эффект.

Регионарная химиотерапия опухолей подразумевает воздействие на опухоль цитостатика в повышенных концентрациях с ограничением его поступления в другие органы путём введения в сосуды, питающие новообразование.

При локальной химиотерапии цитостатики в соответствующих лекарственных формах (мази, растворы) наносят на поверхностные опухолевые очаги (кожные язвы), вводят в серозные полости при выпотах (асцит, плеврит) или в спинномозговой канал (интратекально) при поражении мозговых оболочек, внутрипузырно при новообразованиях мочевого пузыря и т. п.

Выделяют следующие виды химиотерапии:

— монохимиотерапию при использовании одного цитостатика,

— комбинированную химиотерапию (полихимиотерапия) при использовании нескольких цитостатиков или цитостатиков в комбинации с гормонами,

— адъювантную химиотерапию,

— неоадъювантную химиотерапию.

Монохимиотерапия всё больше уступает место комбинированной химиотерапии, при которой в результате применения 2–3 и более цитостатиков одновременно или в различной последовательности, иногда в сочетании с гормональными препаратами, удаётся повысить эффективность химиотерапии опухолей. Известно множество комбинаций, в состав которых входят 2–4 и более противоопухолевых препаратов. Это комбинации типа «цитостатик + цитостатик».

Выделяют несколько принципов, или подходов, объясняющих преимущества полихимиотерапии перед монохимиотерапией и указывающих возможные пути создания новых эффективных комбинаций.

1. Для комбинированной химиотерапии обычно подбирают противоопухолевые препараты, совпадающие по противоопухолевой активности, но различающиеся (на молекулярном, клеточном уровнях или на уровне организма) по механизму действия.

2. Исходя из токсикологического принципа, в комбинацию включают препараты, которые при монотерапии активны в отношении данной опухоли, но обладают разной токсичностью.

3. С целью снижения токсичности противоопухолевых препаратов применяют другие лекарственные средства, не обладающие противоопухолевой активностью, снимающие побочные эффекты. Типичным примером комбинации типа «цитостатик + антидот» является использование молграмустима, фолината кальция и метотрексата. Молграмустим защищает нормальные ткани от действия метотрексата, который в этих условиях может применяться в больших дозах.

4. Важным направлением в химиотерапии является биохимическая модификация действия противоопухолевых препаратов, в частности антиметаболитов. Примером такой комбинации «антиметаболит + модификатор его биохимического действия» является сочетание фторопроизводных пиримидина фторурацила с молграмустимом.

Биохимический принцип побуждает включать в комбинации препараты, приводящие к различным биохимическим повреждениям.

5. Цитокинетический принцип заключается в синхронизации клеточных циклов с помощью одного препарата, например винкристина, губительно действующего на клетки в митозе. Клетки, не убитые препаратом, вступают в новый клеточный цикл синхронно. Когда они находятся в фазе S, назначают специфический для этой фазы препарат, например цитарабин. Цитокинетическим принципом можно объяснить эффективность комбинаций с производными нитрозометилмочевины. Препараты этой группы поражают клетки, находящиеся в фазе G_0 (фаза покоя). Однако этот принцип, весьма привлекательный с точки зрения создания рациональных систем комбинированной химиотерапии, практически невозможно использовать для индивидуализации терапевтического режима у отдельного больного, в первую очередь в связи с гетерогенностью клеточного состава опухоли.

При гемобластозах и диссеминированных формах солидных опухолей химиотерапия является основным методом лечения; в то же время в ранних стадиях солидных злокачественных опухолей химиотерапия может быть использована лишь в качестве одного из компонентов комплексного лечения, например в качестве послеоперационной (адъювантной) терапии.

Число опухолевых заболеваний, при которых химиотерапия ведёт к излечению, невелико. О возможностях современной химиотерапии даёт представление табл. 11.1.

Таблица 11.1

Чувствительность солидных злокачественных опухолей и гемобластозов к современным методам лекарственного лечения

Возможно излечение с помощью химиотерапии	Химиотерапия даёт высокую частоту регрессии и продление жизни, излечение наступает менее чем у 10% больных	Достигается регрессия опухоли у 20–50% больных, редко продление жизни	Малочувствительны к химиотерапии
Хориокарцинома матки Опухоль Беркитта Острый лимфобластный лейкоз у детей Злокачественные опухоли яичка Лимфогранулематоз	Острые лейкозы Миеломная болезнь Эритемия Саркома Юинга Рак предстательной железы Рак яичников Мелкоклеточный рак лёгкого Рак тела матки Рак мочевого пузыря Опухоль Вильмса Эмбриональная рабдомиосаркома у детей Лимфосаркомы Ретинобластома	Рак желудка и толстой кишки Немелкоклеточный рак лёгкого Нейробластома у детей Меланома Рак молочной железы* Плоскоклеточный рак головы и шеи Рак гортани Саркомы мягких тканей Остеогенная саркома* Глиобластома Кортикостерома	Рак пищевода Рак печени Рак поджелудочной железы Рак щитовидной железы Рак почки Рак шейки матки Рак влагалища

* Излечение в случае применения адъювантной и неоадъювантной химиотерапии при локализованных (операбельных) формах.

Основным показателем эффективности лечения, как и при других заболеваниях, считают выживаемость больных злокачественными опухолями. Вместе с тем для оценки непосредственного лечебного действия разработаны единые критерии объективного и субъективного эффекта.

Критерием объективного эффекта (эффективности) при лечении солидных опухолей является уменьшение размеров опухоли и метастазов, измеренных как произведение 2 наибольших перпендикулярных диаметров. При невозможности двух измерений определяют один размер.

Комитетом экспертов ВОЗ рекомендованы 4 градации эффекта при солидных опухолях:

1) полная регрессия — исчезновение всех поражений;

2) частичная регрессия — большее или равное 50 % уменьшение всех или отдельных опухолей при отсутствии прогрессирования других очагов;

3) стабилизация (без изменений) — уменьшение менее чем на 50 % при отсутствии новых поражений или увеличение не более чем на 25 %;

4) прогрессирование — большее или равное 25 % увеличение размеров одной или более опухолей или появление новых поражений.

Необходимой минимальной продолжительностью лечебного эффекта считают 4 недели.

Существуют отдельные критерии эффективности при лечении метастазов в кости:

— полная регрессия — полное исчезновение всех поражений на рентгенограммах или сканограммах;

— частичный эффект — частичное уменьшение остеолитических метастазов, их рекальцификация или уменьшение плотности остеобластных поражений;

— стабилизация — отсутствие изменений в течение 8 недель от начала лечения;

— прогрессирование — увеличение существующих или появление новых поражений.

При гемобластозах за критерий эффективности принимается нормализация картины периферической крови и костного мозга.

Продолжительность регрессии (ремиссии) отсчитывают от даты, когда она впервые зарегистрирована, до даты, когда отмечено прогрессирование болезни. При оценке объективного эффекта учитывается также динамика биохимических и других лабораторных показателей. Так, например, в оценке эффективности имеют значение биохимические и иммунологические маркёры опухолей, такие как хорионический гонадотропин при хориокарциноме, α-фетопротеин (реакция Абелева–Татаринова) при несеминомных герминогенных опухолях яичка и раке печени, патологический глобулин при миеломной болезни и другие. Объективная оценка противоопухолевого действия позволяет своевременно изменить или прекратить химиотерапию при её неэффективности.

Субъективный эффект оценивают по изменению статуса, уменьшению или исчезновению болей и изменению массы тела. Статус больного оценивают до начала лечения, в процессе и после его окончания по 5-степенной системе ВОЗ:

0) полностью активен, способен выполнять работу, которую осуществлял до болезни, без ограничений;

1) испытывает трудности при выполнении физической или напряжённой работы; способен выполнять лёгкую или сидячую работу;

2) обслуживает себя полностью, но не способен выполнять работу; большую часть дневного времени проводит не в постели;

3) обслуживает себя с ограничениями; более 50 % времени проводит лёжа;

4) полная инвалидность; не способен обслуживать себя, прикован к постели.

Для характеристики болевого синдрома, аппетита и функции органов рекомендуется следующая шкала:

0) нет симптомов,
1) умеренные симптомы,
2) средней выраженности,
3) тяжёлые,
4) особенно тяжёлые, угрожающие жизни.

В последнее время особое значение придаётся качеству жизни больных (Quality of Life — QL) в процессе химиотерапии. Для оценки качества жизни пользуются специальными анкетами, которые заполняются больными повторно в процессе лечения.

11.2. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств

Противоопухолевые средства, способные уничтожать опухолевые клетки (цитотоксический эффект) или угнетать их пролиферативную активность (цитостатический эффект), можно разделить по происхождению на синтетические и природные.

К синтетическим относятся алкилирующие агенты и антиметаболиты, различающиеся между собой по механизму действия.

К продуктам природного происхождения причисляют антибиотики, вещества растительного происхождения, ферменты и гормоны.

Следует отметить, что такая классификация условна. Так, например, некоторые препараты, отнесённые к гормонам, на самом деле являются их синтетическими аналогами; механизм действия отдельных антибиотиков похож на таковой алкилирующих агентов и др.

Противоопухолевым действием обладают также некоторые препараты группы иммуномодуляторов и модификаторов биологических реакций, которым в связи с их особенностями посвящён специальный раздел справочника. В табл. 11.2 представлены данные об основных группах современных противоопухолевых препаратов в зависимости от их механизма действия.

Таблица 11.2

Основные противоопухолевые препараты

Алкилирующие агенты (образующие ковалентные связи с ДНК)	
Хлорэтиламины	Хлорамбуцил, Мелфалан, Циклофосфамид, Ифосфамид
Эфиры дисульфоновых кислот	Бусульфан
Производные нитрозомочевины	Кармустин, ломустин, арабинопиранозилметил нитрозомочевина
Метилирующие агенты (триазины)	Дакарбазин
Комплексные соединения платины	Цисплатин, Карбоплатин
Антиметаболиты	
Антагонисты фолиевой кислоты (антифолаты)	Метотрексат
Антагонисты пиримидина	Фторурацил, Цитарабин
Антагонисты пурина	Меркаптопурин, Тиогуанин, Флударабин

Таблица 11.2 (*окончание*)

Противоопухолевые антибиотики и близкие к ним препараты	
Актиномицины	Дактиномицин
Антрациклины	Доксорубицин, Эпирубицин, Идарубицин
Антрацендионы	Митоксантрон
Флеомицины	Блеомицин
Прочие антибиотики	Митомицин
Препараты растительного происхождения — ингибиторы митоза	
Винкаалкалоиды	Винбластин, Винкристин, Винорелбин
Таксаны	Паклитаксел, Доцетаксел
Препараты растительного происхождения — ингибиторы топоизомераз ДНК	
Ингибиторы топоизомеразы I	Иринотекан, Топотекан
Ингибиторы топоизомеразы II	Этопозид
Ферментные препараты	
	Аспарагиназа
Гормоны и антигормоны	
Гестагены	Медроксипрогестерона ацетат
Антиэстрогены	Тамоксифен, Торемифен
Антиандрогены	Флютамид, Ципротерона ацетат
Аналоги гонадотропин-релизинрг-гормона	Гозерелин, Лейпрорелин
Ингибиторы ароматазы	Анастрозол, Летрозол, Эксеместан
Гормоноцитостатики	
	Эстрамустин
Другие цитостатические средства	
Моноклональные антитела (MoAb)	Ритуксимаб, Трастузумаб
Дифференцирующие агенты	Третиноин
Иммуномодуляторы экзогенного происхождения	Вакцина БЦЖ
Ингибиторы тирозинкиазы	Иматиниб

11.3. Соединения алкилирующего действия

Так называемые алкилаторы составляют наиболее обширную группу противоопухолевых препаратов, имеющих в молекуле хлорэтиламинные, эпоксидные, этилениминные группы или остатки метансульфоновой кислоты. К алкилирующим агентам относят также производные нитрозомочевины и комплексные соединения платины.

Биологическое действие препаратов этой группы определяется тем, что они присоединяются ко многим веществам путём реакции алкилирования, т. е. замещения атома водорода какого-либо соединения на алкильную группу. Алкилированию подвергаются многие органические соединения, включая макромолекулы, но опре-

деляющим считается взаимодействие с ДНК. В результате нарушения репликации ДНК возникают мутации и гибель клетки. Соответственно, алкилаторы обладают не только противоопухолевым, но и мутагенным и тератогенным действием.

В связи с тем, что они взаимодействуют со сформированными ДНК, РНК и белками, алкилирующие агенты не обладают фазоспецифичностью и действие некоторых из них не зависит от клеточного цикла.

При использовании в качестве носителя алкилирующих групп различных соединений удаётся изменить их свойства, что является основой поиска новых, более совершенных препаратов этой группы.

Большинство алкилирующих агентов хорошо всасывается в желудочно-кишечном тракте, однако в связи с сильным местнораздражающим действием многие из них вводят внутривенно. Через гематоэнцефалический барьер из алкилирующих агентов проникают производные нитрозомочевины и прокарбазин. Как правило, за сутки препараты метаболизируются и выводятся из организма.

В основном, алкилирующие препараты оказывают сходные побочные действия:

— на желудочно-кишечный тракт (тошнота и рвота в первые часы после введения),

— на кроветворение (лейкопения и тромбоцитопения),

— реже проявляется нейротоксичность (парестезии);

— все препараты этой группы оказывают более или менее выраженное иммунодепрессивное действие.

11.3.1. Хлорэтиламины и этиленимины. Препараты этой группы (рис. 11.1) первыми вошли в арсенал онкологов-химиотерапевтов, и многие не потеряли своего значения и в наши дни. Циклофосфамид и ифосфамид относятся к числу препаратов, активно используемых при лечении онкологических больных. Хлорэтиламины и этиленимины активны при гемобластозах, некоторые из них применяются при раке молочной железы, яичников, злокачественных опухолях яичка, мелкоклеточном раке лёгкого и других формах рака.

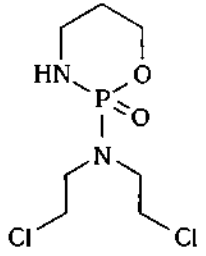


Рис. 11.1. Химическая структура циклофосфамида

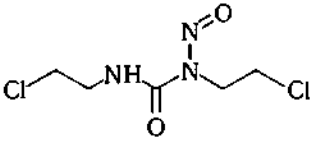


Рис. 11.2. Химическая структура кармустина

11.3.2. Производные нитрозомочевины (рис. 11.2) отличаются от других алкилирующих агентов отсутствием перекрёстной устойчивости по отношению к другим препаратам этой группы, липофильностью и отсроченным миелосупрессивным действием (6–8 недель). Производные нитрозомочевины используются при опухолях ЦНС, а также в комбинированной химиотерапии ряда солидных опухолей и гемобластозов.

11.3.3. Комплексные соединения платины (рис. 11.3) нарушают синтез ДНК путём внутри- и межнитевых сшивок ДНК, а также путём связывания с клеточными мембранами. Препараты этой группы обладают широким спектром противоопухо-

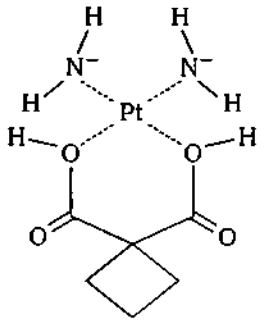


Рис. 11.3. Химическая структура карбоплатина

левого действия и активны при раке яичников, злокачественных опухолях яичка, используются в комбинированной химиотерапии рака лёгкого и ряда других солидных опухолей. Из побочных реакций для препаратов этой группы характерны тошнота и рвота, угнетение миелопоэза, нефро- и нейротоксичность. Карбоплатин обладает меньшей по сравнению с цисплатином почечной токсичностью и большим угнетающим действием на кроветворение.

11.4. Антиметаболиты

Противоопухолевая активность антиметаболитов основана на структурном или функциональном подобии их метаболитам, участвующим в синтезе нуклеиновых кислот. В результате нераспознавания и включения в обмен опухолевой клетки, антиметаболиты либо нарушают функцию ферментов, участвующих в синтезе нуклеиновых кислот, либо включаются в нуклеиновые кислоты, нарушая их код, что ведёт к гибели клеток. В связи с тем, что точкой приложения антиметаболитов является синтез ДНК, они наиболее активны в быстрорастущих клетках и большей частью являются фазовоспецифичными препаратами.

11.4.1. Антагонисты фолиевой кислоты. Препараты этой группы (рис. 11.4), в частности наиболее популярный препарат метотрексат, ингибируют фермент дигид-

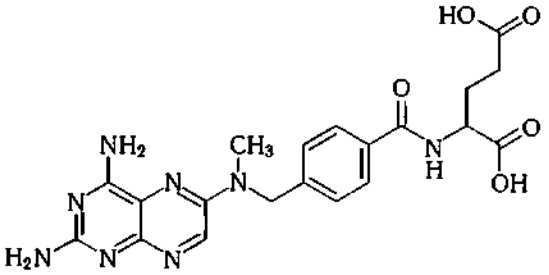


Рис. 11.4. Химическая структура метотрексата

рофолатредуктазу, образуя с ней прочный комплекс, и тем самым блокируют образование из тетрагидрофолиевой кислоты формилтетрагидрофолиевой кислоты и других производных фолиевой кислоты — необходимых участников синтеза пуринов, или тимидиновой кислоты, метионина, серина и гистидина.

Метотрексат в небольших дозах легко всасывается в желудочно-кишечном тракте, однако всасывание больших доз происходит медленно и не полностью. Он прак-

тически не проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому при показаниях (нейролейкемия) его вводят интралюмбально. Побочное действие метотрексата выражается в поражении слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и нарушении функции почек. Наблюдаются также алопеция, угнетение функции костного мозга (лейкопения, тромбоцитопения) и иногда печени.

Использование сверхвысоких доз метотрексата возможно под защитой его антидота лейковорина (фолината кальция), который, превращаясь в тетрагидрофолиевую кислоту, защищает нормальные ткани организма. Метотрексат используется при опухолях головы и шеи, раке молочной железы, трофобластической болезни, остеогенной саркоме, острых лимфолейкозах, лимфомах.

Характерная особенность других антиметаболитов — аналогов пуринов и пиримидинов состоит в том, что они под действием ферментов должны пройти «летальный синтез» и превратиться в биологически активные нуклеотиды, ингибиторы ферментов.

11.4.2. Аналоги пиримидина (рис. 11.5) ингибируют ферменты, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, и могут включаться в ДНК и РНК. Аналог пиримидина фторурацил после введения в организм подвергается разрушению в печени и частично (20%) выводится через почки. После внутривенного введения концентрация фторурацила в плазме уменьшается через 10–20 мин в 2 раза, и через 3 ч препарат практически не определяется. В отличие от этого фторафур постепенно высвобождает фторурацил, и в этом случае концентрация последнего снижается в 2 раза через 5 ч, но и через 24 ч препарат продолжает определяться. Фторафур подвергается деградации в печени и выводится в неизменённом виде почками (25%). Он лучше, чем фторурацил, растворим в липидах, поэтому проникает через гематоэнцефалический барьер и через 1 ч после введения накапливается в одинаковой концентрации в мозге, селезёнке, тонкой кишке, почках и печени. Фторафур всасывается в желудочно-кишечном тракте, поэтому его можно назначать внутрь. Фторурацил применяют при опухолях желудочно-кишечного тракта, раке молочной железы и в составе лекарственных комбинаций при ряде других солидных опухолей. Фторафур используют при тех же опухолях, а также при опухолях мозга.

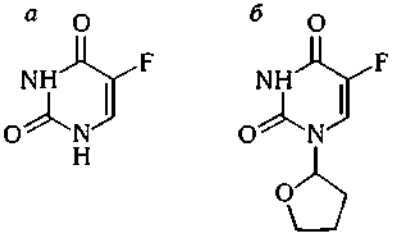


Рис. 11.5. Химическая структура фторурацила (*а*) и фторафура (*б*)

В последние годы получил применение препарат UFT — комплексный препарат, содержащий фторафур и урацил в молярном соотношении 1 : 4.

Основное побочное действие фторурацила и фторафура состоит в действии на желудочно-кишечный тракт и кроветворение; оба препарата у отдельных больных проявляют нейротоксическое действие.

Ралтитрексед (рис. 11.6) является хиназолиновым производным, аналогом тетрагидрофолатного кофактора, это прямой ингибитор тимидилатсинтетазы. Кроме того, торможение тимидилатсинтетазы осуществляется продуктами его метаболизма после полиглутамации. Ни ралтитрексид, ни его метаболиты не инкорпорируются

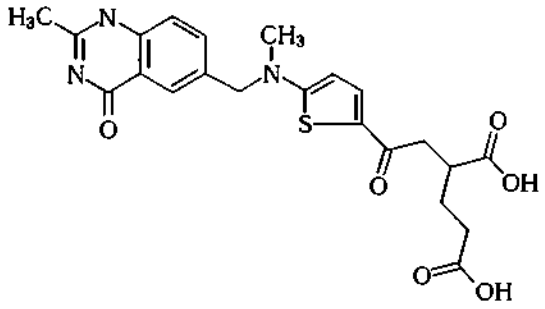


Рис. 11.6. Химическая структура ралтетрексида

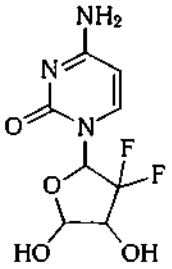


Рис. 11.7. Химическая структура гемцитабина

в нуклеиновые кислоты. Препарат активен при колоректальном раке, резистентном к 5-фторурацилу, а также при раке молочной железы.

Среди аналогов дезоксицитидина (рис. 11.7) практическое применение в онкологии получил цитарабин. Новый препарат этой группы гемцитабин представляет собой 2,2-дифтордезоксицитидин. В процессе метаболизма он подвергается трёхэтапному фосфорилированию. Основной его метаболит — гемцитабин трифосфат включается в концевые участки ДНК, нарушая репликацию и восстановление, подавляя активность ДНК-полимераз. Другие метаболиты гемцитабина на разных этапах также оказывают цитотоксический эффект (так называемый феномен самопотенцирования).

Гемцитабин привлекает внимание клиницистов противоопухолевой активностью при ряде солидных опухолей (рак лёгких, поджелудочной железы, мочевого пузыря).

Флударабин, антагонист пиримидина, фторированный нуклеотидный аналог видарабина, устойчив к аденозиндезаминазе. После ряда метаболических превращений ингибирует РНК-редуктазу, ДНК-полимеразу, ДНК-праймазу и ДНК-лигазу, что ведёт к нарушению синтеза ДНК. Частично ингибирует РНК-полимеразу II и тормозит синтез белка.

Показания к применению — хронический В-клеточный лимфолейкоз, неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности; противопоказания — гиперчувствительность, почечная недостаточность (клиренс креатинина < 30 мл/мин), беременность, кормление грудью. Возможны побочные эффекты: миелосупрессия, диспепсические явления, нейропатия, учащение мочеиспускания, инфекционные осложнения, одышка, кашель, отёки, синдром лизиса опухоли, аллергические реакции и другие.

Флударабин применяют внутривенно, капельно по 25 мг/м^2/сут или перорально по 40 мг/м^2/сут в течение 5 сут через каждые 28 сут. Лечение продолжают до достижения максимального эффекта (обычно 6 циклов).

11.4.3. Аналоги пуринов. Антагонисты пуринов (рис. 11.8) нарушают синтез ДНК и РНК за счёт изменения обмена пуринов. Меркаптопурин и 6-тиогуанин являются аналогами пуринов и отличаются от естественных (гипоксантин и гуанин)

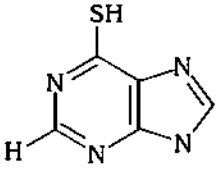


Рис. 11.8. Химическая структура меркаптопурина

тем, что атом кислорода заменён на серу. Метаболизируются в организме до 6-тиомочевой кислоты и неорганического сульфата. Эти препараты используются при лечении лейкозов и неходжкинских лимфом, их основное побочное действие — угнетение костномозгового кроветворения и поражение слизистой желудочно-кишечного тракта и ротовой полости.

Новые препараты этой группы пентостатин, кладрибин, флударабин также обладают противоопухолевой активностью при гемобластозах.

11.5. Противоопухолевые препараты природного происхождения

К препаратам природного происхождения относятся противоопухолевые антибиотики, вещества растительного происхождения, ферменты.

11.5.1. Противоопухолевые антибиотики. Данные вещества подавляют синтез нуклеиновых кислот, действуя на уровне ДНК-матрицы. Дактиномицин (продукт жизнедеятельности актиномицет *Str. parvullus* и др.), доксорубицин (антрациклиновый антибиотик из гриба *Streptomyces peucetius var. caesius*) образуют с ДНК комплексы, препятствующие продвижению ферментов вдоль ДНК-матрицы. Блеомицин (*Str. verticillus*) вызывает одиночные разрывы ДНК, митомицин по механизму действия близок к алкилаторам, вызывая связывание и повреждение ДНК.

Из актиномицинов (рис. 11.9) практическое применение находит актиномицин Д (Дактиномицин). Дактиномицин через несколько минут после внутривенного введе-

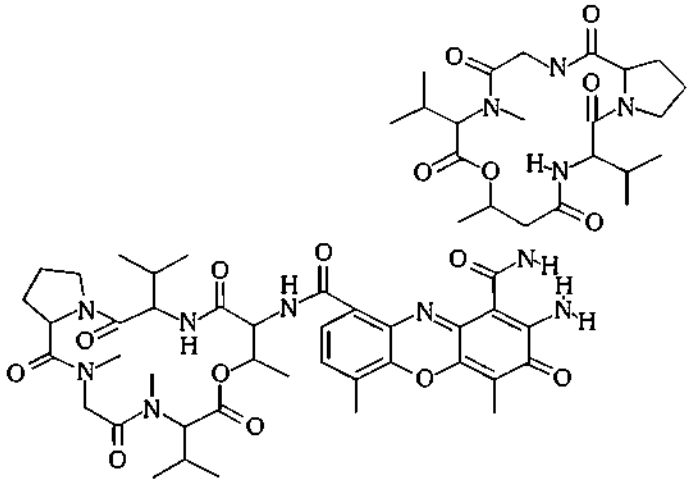


Рис. 11.9. Химическая структура дактиномицина

ния исчезает из кровотока, в неизменённом виде выводится из организма с желчью (50%) и мочой (10%). Препарат накапливается в печени, почках, селезёнке и слюнных железах, в незначительных количествах проникает в семенники и головной мозг. Дактиномицин применяют при хориокарциноме, опухоли Вильмса и в комбинации с другими препаратами при ряде других опухолей. Среди побочных действий на первый план выступают нарушения желудочно-кишечного тракта, повреждение слизистой оболочки ротовой полости, угнетение кроветворения.

Наибольшее применение в клинике получили антрациклиновые антибиотики (рис. 11.10). Механизм их действия сводится к интеркаляции и ковалентному связыванию ДНК, торможению топоизомеразы II, формированию свободных радикалов.

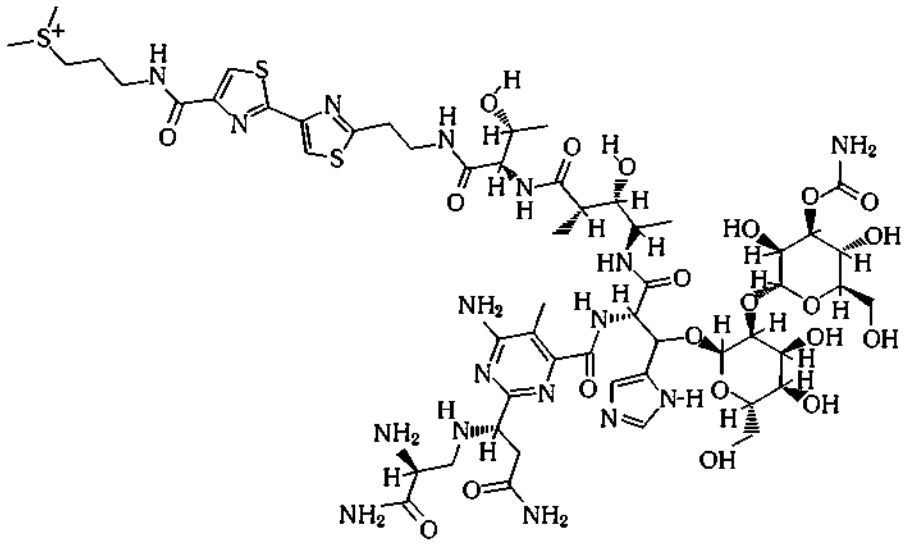


Рис. 11.10. Химическая структура доксорубицина

Антрациклиновые антибиотики быстро исчезают из крови, но выделяются сравнительно медленно с мочой (20%) и калом (10%) в течение 2 сут. Препараты этой группы — доксорубицин (адриамицин), карминомицин, фарморубицин (эпирубицин) — применяют при гемобластозах и солидных опухолях. Наибольшее практическое применение в связи с широким спектром противоопухолевого действия получил доксорубицин, активный при раке молочной железы, мелкоклеточном раке лёгкого, остеогенных саркомах, саркомах мягких тканей и гемобластозах. Кроме типичных для цитостатиков побочных явлений (тошнота, рвота, угнетение костномозгового кроветворения, алопеция), антрациклиновые антибиотики кардиотоксичны. Эпирубицин менее кардиотоксичен, чем доксорубицин.

К группе антрациклиновых антибиотиков относится также идарубицин (рис. 11.11), активный при острых лейкозах.

Близки к антрациклинам синтетические препараты группы антрацендионов и антрапиразолов. Практическое применение получил митоксантрон, эффективность которого при раке молочной железы близка к эффективности доксорубицина при меньшей токсичности. Митоксантрон встраивается между парами оснований ДНК, ингибирует синтез РНК и митоз (преимущественно в поздней стадии S-фазы). Действует как на пролиферирующие, так и на непролиферирующие клетки. Наиболее высокие концентрации препарата создаются в щитовидной железе, лёгких, печени, сердце и эритроцитах. Дозозависимо и необратимо (при продолжительном лечении) угнетает функции половых желёз, вызывая аменорею или азооспермию. Кроме того, длительное применение может способствовать развитию вторичных злокачественных опухолей (отдалённый эффект). Экскретируется через гепатобилиарную систему (25% дозы обнаруживается в кале через 5 дней после внутривенного введения) и почки. Выведение почками лимитировано: только 6–11% дозы появляется в моче через 5 дней приёма (65% — неизменённый препарат, 35% — 2 неактивных кислых метаболита и их глюкурониды). Большая часть препарата активно связывается в тканях и высвобождается постепенно, обусловливая тенденцию к кумуляции. Митоксантрон практически не удаляется при гемодиализе или перитонеальном диализе.

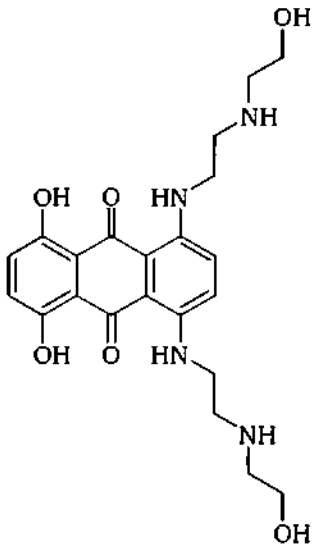


Рис. 11.11. Химическая структура митоксантрона

К антибиотикам группы флеомицинов относятся блеомицин. Блеомицин в тканях подвергается ферментной инактивации, причём активность инактивирующего фермента в коже и лёгких ниже, чем в других органах. Блеомицин активен при плоскоклеточном раке различных локализаций и лимфогранулематозе; он используется в комбинированной химиотерапии опухолей яичка и гемобластозов, особенно в связи с тем, что не оказывает побочного действия на кроветворение. Блеомицин подавляет синтез нуклеиновых кислот (преимущественно ДНК) и белка. Взаимодействие с ДНК сопровождается индукцией лабильности её молекулы, разрывом одной или обеих цепей с последующим образованием свободных радикалов. Фрагментация ДНК предположительно является следствием окисления комплекса ДНК–блеомицин–Fe(II) и причиной хромосомных аберраций. Активен в отношении клеток, находящихся как в митотическом цикле, так и вне его, но проявляет большую активность в фазе G_2. Отмечаются такие побочные эффекты, как гипертермия, дерматиты, стоматит, алопеция. Наиболее серьёзным осложнением является развитие пульмонита, часто без повышения температуры, завершающегося фиброзом.

11.5.2. Противоопухолевые препараты растительного происхождения. Среди противоопухолевых препаратов растительного происхождения наибольший практический интерес представляют винкаалкалоиды (винбластин, винкристин и винорелбин), содержащиеся в растениях барвинок розовый (*Vinca rosea*) и катарантус розовый (*Catharantus roseus*), таксаны (паклитаксел, полученный из тихоокеанского тисса *Taxus brevifolia* и доцетаксел, синтезированный с использованием алкалоида баккатина, полученного из европейского тисса *Taxus baccata*), камптотецины (иринотекан и топотекан), впервые полученные из растения *Camptotheca acuminata*, подофиллотоксины (этопозид и тенипозид), синтетические производные подофиллотоксинов, выделяемых из *Podophyllum peltatum*.

По механизму действия они разделяются на

— препараты, точкой приложения которых являются микротрубочки митотического аппарата клетки (винкаалкалоиды и таксаны),

— ингибиторы топоизомераз ДНК: ингибиторы топоизомеразы I (камптотецины) и ингибиторы топоизомеразы II (подофиллотоксины).

Винкаалкалоиды (рис. 11.12) имеют минимальные отличия в химической структуре, сходный механизм действия, но отличаются спектром противоопухолевого

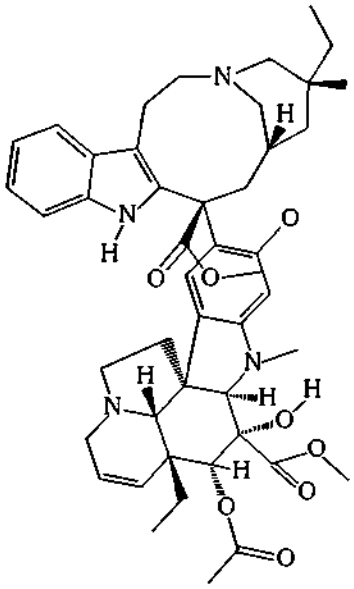


Рис. 11.12. Химическая структура винбластина

действия и побочными эффектами. Механизм действия этих препаратов сводится к денатурации тубулина — белка, который входит в состав микротрубочек митотического веретена и ряда поверхностных антигенов лимфоцитов. Взаимодействие винкаалкалоидов с тубулином вызывает деполяризацию последнего, приводит к остановке митоза и нарушению клеточно-специфических функций лимфоцитов.

Винбластин применяют при лимфогранулематозе, лимфосаркомах, опухолях яичка, хориокарциноме матки, нейробластоме. Винбластин обратимо блокирует митотическое деление клеток в метафазе клеточного цикла. Механизм действия связан с влиянием на метаболизм аминокислот, в частности на уровне включения глутаминовой кислоты в цикл Кребса и превращения в мочевину. В опухолевых клетках препарат селективно угнетает синтез ДНК и РНК посредством торможения фермента РНК-полимеразы.

Винкристин широко используют в комбинированной химиотерапии гемобластозов, рака молочной железы, лёгкого и других злокачественных опухолей.

Эти алкалоиды дают разный побочный эффект: угнетение кроветворения лимитирует применение винбластина, нейротоксичность (парестезии, невралгические боли, атаксия, арефлексия, парез кишечника) — винкристина. К винкаалкалоидам относят также виндезин и винорельбин (навельбин). Эти препараты обладают противоопухолевой активностью при некоторых солидных опухолях: виндезин при раке лёгкого, винорельбин при раке молочной железы и раке лёгкого.

Таксаны, так же как и винкаалкалоиды, являются антимитогенами, однако механизм их действия на микротрубочковый аппарат клетки отличен. Таксаны стимулируют полимеризацию клеточного белка тубулина и препятствуют его деполимеризации, сдвигая равновесие в сторону образования избытка дефектных микротрубочек, индуцируют аномальное расположение микротрубочек в виде пучков на протяжении всего клеточного цикла и множественных звездчатых сгущений (астеров) в течение

митоза, что приводит к нарушению процесса формирования клеточного веретена и задержке клеток в G_2- и М-фазах митоза. Блокируется процесс деления клетки и повреждается её цитоскелет, что приводит к нарушению подвижности, внутриклеточного транспорта и передачи трансмембранных сигналов.

Несмотря на сходное строение и общий механизм действия, паклитаксел и доцетаксел отличаются по ряду клинических показателей. Оба препарата оказывают выраженный противоопухолевый эффект при раке молочной железы, яичников, немелкоклеточном раке лёгкого и эпителиальных опухолях головы и шеи. Окончательная клиническая оценка таксанов является предметом текущих клинических исследований.

Клинические испытания проходит препарат патупилон, стабилизирующий микротрубочки (рис. 11.13, цветная вклейка). Согласно исследованиям, патупилон блокирует митоз и активирует апоптоз эффективнее, чем паклитаксел. Кроме того, он оказывает воздействие на клетки, резистентные к паклитакселу и другим химиотерапевтическим препаратам.

Открытые в 1970-х гг. ферменты топоизомеразы I и II, контролирующие репликацию и транскрипцию ДНК, стали новой мишенью противоопухолевой лекарственной терапии.

Ингибиторами топоизомеразы I (рис. 11.14) являются дериваты камптотецина — иринотекан и топотекан. Первый из этих препаратов привлёк внимание противоопухолевой активностью при колоректальном раке, второй — активностью при резистентном к производным платины раке яичников. Иринотекан — специфический ингибитор топоизомеразы I, действующий преимущественно в S-фазе клеточного цикла. В организме метаболизируется с образованием активного метаболита SN-38, который превосходит по своей активности иринотекан. Иринотекан и его метаболит SN-38 стабилизируют комплекс топоизомеразы I с ДНК, что препятствует процессу репликации. Обладает антихолинэстеразной активностью. Топотекан ингибирует топоизомеразу I, связывается с комплексом топоизомераза-ДНК и препятствует респирализации.

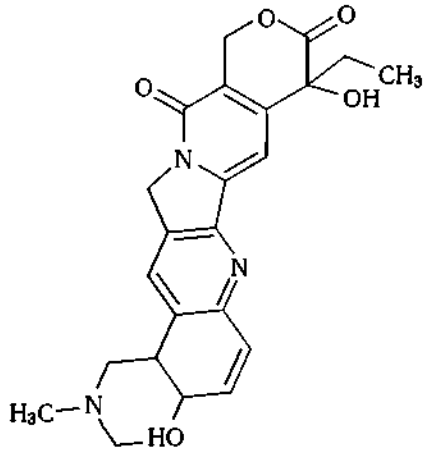


Рис. 11.14. Химическая структура топотекана

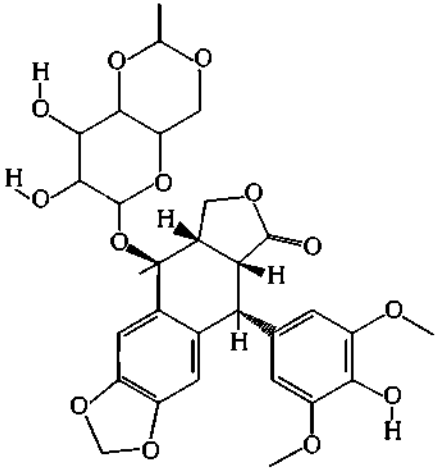


Рис. 11.15. Химическая структура этопозида

Ингибиторами топоизомеразы II (рис. 11.15) являются производные подофиллотоксинов тенипозид и этопозид. Для них характерно блокирование клеток в фа-

зе G_2, т. е. торможение их вступления в митоз. Этопозид хорошо всасываются при приёме внутрь, оба препарата выделяются преимущественно с мочой. Этопозид оказывает фазоспецифичное цитотоксическое действие (влияет на клетки в позднюю S- и G_2-фазы клеточного цикла). Действие на клетки является дозозависимым. В высоких концентрациях вызывает лизис клеток, входящих в стадию митоза. В низких концентрациях препарат тормозит вступление клеток в профазу митоза. Превалирующим макромолекулярным эффектом этопозида является влияние на ДНК: он ингибирует активность топоизомеразы II, воздействуя на пространственную структуру фермента и тем самым нарушая процесс репликации ДНК, тормозит клеточный цикл, задерживает пролиферацию клеток. Этопозид может подавлять транспорт нуклеотидов, препятствуя таким образом синтезу и восстановлению ДНК.

Этопозид применяется при раке лёгкого, неходжкинских лимфомах, остром миелолейкозе, опухолях яичка. Основные побочные эффекты: гематотоксичность, гастроинтестинальная токсичность, алопеция, периферические нейропатии.

11.5.3. Ферменты. Поиск ферментов, воздействующих на опухолевую клетку, привёл к созданию препарата аспарагиназы, используемой при лейкозах. Клетки отдельных опухолей не синтезируют аспарагин и используют аспарагин, имеющийся в крови и лимфе. Аспарагиназа катализирует гидролиз аспарагина, что приводит к нарушению биосинтеза белков, в первую очередь в быстроделящихся лейкозных клетках. Препарат значительно уменьшает число опухолевых клеток в периферической крови и костном мозге. Однако и некоторые нормальные клетки не могут синтезировать аспарагин (например, лимфоциты).

Концентрация аспарагина в крови после внутривенного введения препарата снижается в среднем через 18 ч. При ежедневном применении поддерживается постоянный уровень аспарагиназы в крови, причём после окончания инъекций измеримая активность фермента определяется в течение 10 дней. При приёме внутрь аспарагиназа теряет активность.

11.6. Гормоны и антагонисты гормонов

Гормоны и антагонисты гормонов (антигормоны), обладающие противоопухолевой активностью и используемые в онкологической клинике, включают ряд стероидных гормонов и их синтетические производные, а также нестероидные синтетические соединения со стероидным и стероид-антагонистическим действием, аналоги рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона гипофиза. Механизм действия препаратов этой группы сложен и связан как с их способностью изменять гормональные соотношения в организме, так и с возможностью непосредственно влиять на опухолевые клетки. Наличие специфических рецепторов гормонов в опухолевых клетках лежит в основе их чувствительности к препаратам этой группы. Действие антагонистов гормонов определяется их конкуренцией с соотвстствующими гормонами на уровне клеточных рецепторов.

Задача гормональной терапии гормонозависимых опухолей — подавить продукцию гипофизарных и тканевых гормонов-стимуляторов роста опухолевых клеток и блокировать передачу сигналов, способствующих прогрессии последних.

Стероидные гормоны образуют комплексы с белковыми молекулами рецепторов, проникают в ядра клеток, связываются с хроматином и нарушают синтез нуклеиновых кислот в клетках-мишенях (клетках, чувствительных к данному гормону); в определённых дозах они угнетают пролиферативные процессы в молочной железе (антиэстрогены), предстательной железе (антиандрогены), эндометрии (гестагены).

Возможны также стимуляция или торможение аутокринных и паракринных факторов роста. Эффект гормонотерапии может осуществляться также с помощью непрямого воздействия на гипоталамус и продуцируемые им гормоны, регулирующие продукцию гормонов гипофиза. В конечном счёте, мишенью гормонотерапии является опухолевая клетка, сохранившая некоторую способность отвечать на прямые или опосредованные гормональные воздействия.

Механизм действия прогестинов (гестагенов) (рис. 11.16) связывают с их влиянием на уровне рецепторов клетки, содействуя её дифференцировке. Применяются при раке эндометрия и при раке молочной железы.

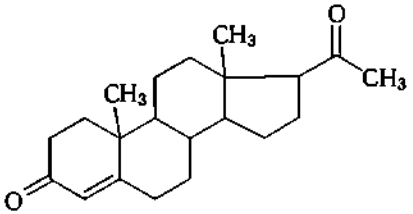


Рис. 11.16. Химическая структура прогестерона

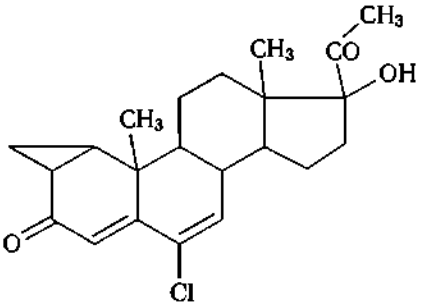


Рис. 11.17. Химическая структура ципротерона

К антиандрогенам (рис. 11.17) относят ряд соединений стероидной и нестероидной структур, способных подавлять физиологическую активность эндогенных андрогенов. Их действие связано с конкурентным блокированием рецепторов андрогенов в тканях-мишенях, биосинтез и секрецию андрогенов они не нарушают. Антиандрогенное действие свойственно в той или иной степени ряду эндогенных стероидных соединений, в том числе прогестинам, эстрогенам и их синтетическим производным, а также некоторым производным самих андрогенов. Из стероидных антиандрогенов наиболее известен ципротерон. В 1970-х гг. появились сообщения о высокой антиандрогенной активности нестероидных соединений — производных карбоксианилида (флутамид и др.). Антиандрогены применяют в основном при раке предстательной железы.

Среди антиандрогенов выделяют вещества, которые только блокируют андрогенные рецепторы (так называемые чистые андрогены) — бикалутамид, флутамид, и вещества, которые, кроме способности блокировать рецепторы, имеют гонадотропную активность (так называемые антиандрогены двойного действия) — ципротерон.

Флутамид и бикалутамид (рис. 11.18) блокируют связывание андрогенов с клеточными рецепторами, вследствие чего препятствуют проявлению биологических эффектов андрогенов в андрогенчувствительных органах, в том числе в клетках

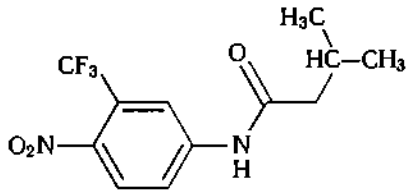


Рис. 11.18. Химическая структура флутамида

предстательной железы, и таким образом препятствуют росту опухоли. После приёма флутамида отмечается повышение плазменных уровней тестостерона и эстрадиола.

Ципротерон обладает более выраженным андрогенным действием, так как помимо блокирования действия дигидротестостерона на уровне рецепторов, подавляет высвобождение гонадотропинов и, следовательно, синтез андрогенов. Одновременно с тестостероном в крови снижается содержание ЛГ и ФСГ.

Особым видом антиандрогенной активности обладают соединения, ингибирующие 5-α-редуктазу (рис. 11.19) — внутриклеточный фермент предстательной железы, способствующий превращению тестостерона в более активный андроген — дигидротестостерон (ДГТ). Одним из ингибиторов 5-α-редуктазы является финастерид, применяющийся при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы.

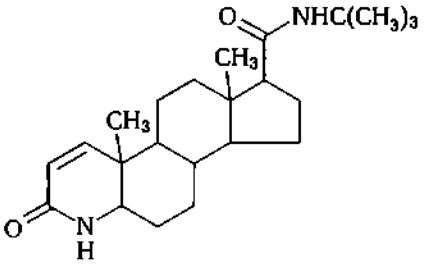


Рис. 11.19. Химическая структура финастерида

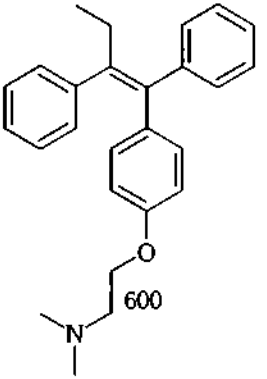


Рис. 11.20. Химическая структура тамоксифена

Обычно антиандрогены применяются в сочетании с агонистами LHRH (leuteinizing hormone releasing hormone). При применении агонистов LHRH развиваются побочные эффекты, которые можно контролировать при помощи антиандрогенов. Использование комбинаций препаратов этих двух групп позволило повысить выживаемость пациентов с раком простаты.

Антиэстрогены (рис. 11.20) блокируют рецепторы эстрогенов. Комплекс рецептор–гормон контролирует промоторный участок гена, от которого зависит рост клетки. Препараты этой группы тамоксифен и торемифен (фарестон) являются первой линией гормонотерапии при раке молочной железы. Торемифен конкурентно связывается с эстрогенными рецепторами и препятствует образованию эстрогенрецепторного комплекса, ингибирует стимулируемый эстрогенами синтез ДНК и подавляет деление клеток.

Тамоксифен является эталонным препаратом для лечения рака молочной железы (особенно у женщин в менопаузе). Клиническое использование тамоксифена было начато в 1973 г. В настоящее время тамоксифен является широко используемым препаратом как для проведения адъювантной терапии, так и при лечении больных с диссеминированным процессом. Показано, что тамоксифен эффективен при всех стадиях заболевания, хорошо переносится при приёме в терапевтических дозах. Кроме основного показания (рак молочной железы у женщин), тамоксифен применяют при лечении рака грудной железы у мужчин, рака эндометрия, рака предстательной железы, опухолей гипофиза и других раковых заболеваний.

Ингибиторы ароматазы (рис. 11.21) начали применяться в онкологической практике в 1970–1980-е гг. XX в. Ароматаза — цитохром-Р450-зависимый фермент,



Рис. 11.21. Мишени действия ингибиторов ароматазы

отвечающий за превращение синтезирующихся в коре надпочечников андрогенов в эстрогены. Ароматаза присутствует в различных тканях и органах, включая яичники, жировую ткань, скелетные мышцы, печень, а также ткань опухоли молочной железы. У женщин в пременопаузе основным источником циркулирующих эстрогенов являются яичники, тогда как в постменопаузе эстрогены образуются главным образом вне яичников. Ингибирование ароматазы приводит к уменьшению образования эстрогенов у женщин как в пременопаузе, так и в постменопаузе. Однако в пременопаузе снижение биосинтеза эстрогенов компенсируется усилением синтеза гонадотропинов по принципу обратной связи — снижение синтеза эстрогенов в яичниках стимулирует выработку гипофизом гонадотропинов, которые, в свою очередь, усиливают синтез андростендиона, и уровень эстрогенов вновь повышается. В связи с этим ингибиторы ароматазы неэффективны у женщин в пременопаузе. В постменопаузе, когда яичники перестают функционировать, связь гипоталамус–гипофиз–надпочечники разобщена, и ингибирование ароматазы приводит к значительному подавлению биосинтеза эстрогенов в периферических тканях, а также в ткани опухоли молочной железы.

Первым и фактически единственным представителем ингибиторов ароматазы первого поколения является аминоглутетимид — неселективный ингибитор ароматазы. Поскольку аминоглутетимид ингибирует целый ряд ферментов, участвующих в сте-

роидогенезе (подавляет секрецию надпочечниками глюкокортикоидов), при его применении необходимо следить за функциональным состоянием коры надпочечников (может развиться её гипофункция).

Поиски новых средств, обладающих большей селективностью, лучшей переносимостью и более удобным режимом дозирования, привели к появлению ингибиторов ароматазы второго и третьего поколений. К настоящему времени созданы новые нестероидные (летрозол, анастрозол и др.) и стероидные (экземестан) соединения этой группы, необратимо связывающиеся с активным центром ароматазы.

Основным показанием для применения ингибиторов ароматаз является рак молочной железы у женщин в постменопаузе, в том числе при резистентности к терапии антиэстрогенами.

Аналоги рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона гипофиза (ЛГРГ) (рис. 11.22) подавляют продукцию лютеинизирующего и фолликулостимулирующего

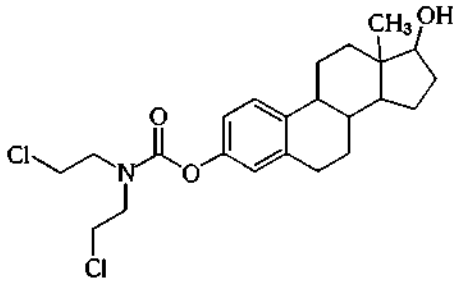


Рис. 11.22. Химическая структура эстрамустина

гормонов гипофиза, соответственно ингибируя продукцию тестостерона либо эстрогенов гонадами. При продолжительном систематическом приёме (или как депо-формы) эти лекарственные средства вызывают сначала стимулирующий эффект (проявляется некоторым повышением содержания тестостерона в крови у мужчин и эстрогенов у женщин), затем (примерно через 3 недели приёма) подавляют высвобождение ЛГ и ФСГ, снижают тестикулярный синтез андрогенов и, соответственно, содержание половых гормонов в крови, вплоть до полного их отсутствия. Эффект является обратимым, и после окончания приёма препаратов содержание тестостерона и эстрогенов в крови восстанавливается.

Аналоги ЛГРГ применяют при раке предстательной железы, молочной железы, эндометриозе, при фиброме матки.

Следует отметить, что применение стероидных гормонов (эстрогенов и андрогенов) при раке молочной железы и раке предстательной железы практически уступило место использованию антигормонов (антиэстрогенов и антиандрогенов), ингибиторов ароматазы и суперагонистов рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона гипофиза. Эти препараты, не обладая побочными эффектами типа выраженной феминизации или вирилизации, обладают не меньшей эффективностью, особенно у больных с положительными рецепторами стероидных гормонов.

Особую группу составляют гормоноцитостатики — препараты, обладающие цитостатическим и гормональным действием, такие как эстрамустин (эстрацит). Эстрамустин применяют для лечения рака предстательной железы. Проникая внутрь клеточного ядра, он избирательно ингибирует процессы митотического деления; кроме того, воздействуя на переднюю долю гипофиза, эстрацит уменьшает продукцию гонадотропных гормонов, снижая уровень тестостерона в крови.

11.7. Модификаторы биологических реакций и иммунотерапия опухолей

Модификаторами биологических реакций (МБР) называются агенты, обладающие способностью изменять биологическую реакцию организма-носителя на опухоль таким образом, что это оказывает благоприятный терапевтический эффект. Это воздействие может определяться следующими факторами:

1) повышением иммунной защиты путём применения агентов природного происхождения, их синтетических дериватов или аналогов в качестве эффекторов или медиаторов ответа на опухоль;

2) усилением противоопухолевого иммунитета путём повышения или восстановления эффекторного механизма, либо путём подавления тех компонентов реакции организма на опухоль, которые могут снижать противоопухолевое действие;

3) усилением прямого противоопухолевого ответа путём модификации опухолевых клеток или антигенов опухолевых клеток, что может стимулировать индивидуальный иммунный противоопухолевый ответ организма;

4) снижением трансформации и/или усилением дифференцировки (созреванием опухолевых клеток);

5) повышением способности нормальных клеток организма переносить повреждающее действие цитостатических воздействий в процессе противоопухолевой терапии;

6) модификацией других биологических аспектов взаимоотношений организма-носителя и опухоли, например торможением процесса метастазирования и неоангиогенеза.

Среди модификаторов биологических реакций наиболее изучены и получили клиническое применение иммуномодуляторы, к которым относятся цитокины (интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы), моноклональные антитела, дифференцирующие агенты, антиангиогенезные факторы.

Модификаторами биологических реакций в широком смысле являются все вещества как природного, так и синтетического происхождения, оказывающие противоопухолевый эффект опосредованно, путём влияния на организм носителя опухоли. Однако исследования последних лет позволили понять ряд особенностей механизма противоопухолевого иммунитета, в частности оценить значение цитокинов.

Цитокины — биологически активные вещества пептидной природы, вырабатываемые клетками иммунной системы и являющиеся одновременно продуктами жизнедеятельности этой системы и её основными регуляторами. В настоящее время по своим функциональным свойствам цитокины подразделяются на группы.

Колониестимулирующие факторы (КСФ) — это цитокины, необходимые для прогрессии от полипотентной стволовой клетки до зрелых дифференцированных клеток крови, обладающие также способностью влиять на функцию последних.

С момента открытия в 1983–85 гг. этих гемопоэтических факторов роста непрерывно изучались их структура, функция, возможность получения в достаточных количествах для клинического изучения.

Семь гемопоэтических факторов роста не только изучены достаточно подробно, но и исследованы с точки зрения возможности их клинического применения. Известна их структура, найдены рецепторы на поверхности клеток-мишеней, специфические для каждого фактора, известна локализация кодирующих их генов. Эти колониестимулирующие факторы теперь получаются методами биотехнологии и активно изучаются в клинике.

К ним относятся:

— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), стимулирующий продукцию нейтрофилов,

— гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ), стимулирующий продукцию гранулоцитов и макрофагов, макрофагальный КСФ (М-КСФ), стимулирующий продукцию моноцитов,

— интерлейкин-3 (IL-3) и интерлейкин-11 (IL-11), обладающие способностью влиять на клетки-предшественники белой, красной крови и мегакариоцитов,

— эритропоэтин (ЭПО), влияющий на клетки-предшественники эритроцитов и мегакариоцитов, и

— тромбопоэтин, стимулирующий развитие мегакариоцитов.

Два их них — ГМ-КСФ, выпускаемый под названием Лейкомакс, и Г-КСФ, выпускаемый в негликозилированной (Нейпоген или Филграстим) и гликозилированной (Граноцит или Ленограстим) формах, широко используются в клинике для борьбы с нейтропенией, а также с целью предупреждения миелосупрессии при интенсификации химиотерапии.

Применение этих препаратов позволяет уменьшить число опасных для жизни инфекционных осложнений, которые развиваются у больных с нейтропенией.

В то же время ГМ-КСФ и Г-КСФ не предупреждают развития тромбоцитопении. Поэтому особый интерес представляет клиническое изучение ИЛ-3 и тромбопоэтина, которые оказались эффективными при тромбоцитопении. В России используются препараты эритропоэтина (эритропоэтин-α и эритропоэтин-β).

Молграмостим — рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, представляющий собой водорастворимый негликозилированный белок, содержащий изолейцин в положении 100. Обладает способностью стимулировать пролиферацию и активацию гранулоцитов и моноцитов/макрофагов.

Применяется у больных, получающих миелосупрессивную противоопухолевую химиотерапию, особенно в случае интенсификации лечения для уменьшения степени нейтропении и снижения риска инфекционных осложнений, а также у больных с другими состояниями недостаточности костного мозга (миелодиспластические синдромы, апластическая анемия), при пересадках аутологичного или сингенного костного мозга для ускорения восстановления миелоидного кроветворения, при лейкопениях, вызванных инфекциями (включая ВИЧ-инфекцию).

Наиболее часто отмечающиеся побочные эффекты — это подъём температуры, тошнота, одышка, понос, высыпания, судороги, реакции в месте инъекции (при подкожном введении), рвота, чувство усталости, анорексия, мышечно-скелетные боли и астенические явления.

Ленограстим — высокоочищенный рекомбинантный протеин, регулирующий механизм пролиферации дифференцировки и активности клеток крови нейтрофильного ряда, увеличивая количество нейтрофилов в периферической крови и повышая их способность к фагоцитозу и миграции. Применяется для профилактики и лечения нейтропении у больных, получающих миелосупрессивную цитостатическую терапию по поводу немиелоидных злокачественных опухолей при трансплантации костного мозга и периферических стволовых клеток, а также у больных с врождёнными и приобретёнными аплазиями костного мозга и ВИЧ-инфекцией. При химиотерапии граноцит применяют через сутки после окончания курса лечения и вводят подкожно ежедневно до достижения стабильного уровня нейтрофилов в периферической крови. При трансплантации костного мозга вводят внутривенно в течение 30 мин, ежедневно до стабильной нормализации содержания количества нейтрофилов в периферической крови.

Побочные эффекты — мышечные и костные боли, лейкоцитоз, тромбоцитопения, боль в месте введения.

Американское общество клинической онкологии следующим образом формулирует общие показания к применению Ленограстима и Молграмостима.

1. Для уменьшения возможности развития нейтропении при проведении 1-го цикла химиотерапии, если риск возникновения этого осложнения выше или равен 40% (первичная профилактика).

2. При проведении повторных циклов химиотерапии, если предыдущий цикл осложнился фебрильной нейтропенией, а снижение дозы цитостатиков нежелательно (вторичная профилактика).

3. При высокодозной химиотерапии под защитой трансплантацией стволовых клеток периферической крови или аутотрансплантацией костного мозга.

4. Реже при лечении развившейся фебрильной нейтропении, обычно при угрожающей жизни инфекции или при необходимости проведения длительной терапии антибиотиками и противогрибковыми препаратами.

Эпоэтин — рекомбинантный человеческий эритропоэтин, способствующий образованию эритроцитов из стволовых клеток. В онкологической практике используется в основном при анемиях, осложняющих химиотерапию немиелоидных злокачественных новообразований, в частности при длительном применении соединений платины, а также при анемиях, осложняющих течение опухолевого заболевания, и у ВИЧ-инфицированных больных, получающих лечение зидовудином.

Выпускается в виде эпоэтина-α и эпоэтина-β.

11.8. Моноклональные антитела с противоопухолевой активностью

В настоящее время используются моноклональные антитела к ассоциированным с опухолью антигенам, дифференцировочным антигенам лейкоцитов и онкогенам. Антитела, связывающиеся с опухолевоассоциированными антигенами, могут повреждать опухолевые клетки, а также могут быть использованы в качестве направленных носителей токсинов (иммунокины) и радиоизотопов (последнее и для иммунолокализации).

Изучен ряд антигенов поверхности опухолевых клеток, которые могут служить мишенью для применения антител с диагностической и терапевтической целью. Первыми с этой целью в эксперименте были исследованы мышиные антитела, которые, как оказалось, невозможно использовать в клинике. Создание методом генной инженерии на их основе химерных гуманизированных антител позволило получить препараты, пригодные для клинического применения.

Высокая эффективность моноклональной терапии связана с механизмами действия антител. К основным механизмам цитотоксического действия антител, взаимодействующих с антигенами опухолевых клеток, относятся активация системы комплемента, индукция антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности, индукция апоптоза, блокада рецепторов и прерывание внутриклеточных сигнальных цепей, блокада биоактивных молекул, важных для реализации злокачественного фенотипа, индукция идиотип-антиидиотипического ответа.

Алемтузумаб — генно-инженерные гуманизированные IgG_1 $\varkappa$-моноклональные антитела; вызывают лизис лимфоцитов за счёт взаимодействия с антигеном CD52, который экспрессируется на поверхности всех В- и Т-лимфоцитов, а также моноцитов, тимоцитов и макрофагов. Не повреждает стволовые кроветворные клетки и клетки-предшественники; показания — хронический лимфолейкоз.

Ритуксимаб — гуманизированное (полученное с помощью гена антител приматов) антитело, реагирующее с CD20 В-клеток; этот препарат используется в клинике при лечении рефрактерной к химиотерапевтическим препаратам В-клеточной неходжкинской лимфомы. Механизм действия Ритуксимаба связан с развитием опосредованной антителозависимой клеточной и комплементопосредованной цитотоксичности, что вызывает апоптоз в клетках лимфомы и нормальных $CD20^+$-лимфоцитах. Происходит снижение уровня циркулирующих В-лимфоцитов $CD20^+$ — как лимфомных, так и нормальных. Период низкого уровня нормальных В-лимфоцитов продолжается 3–6 месяцев. При этом не замечено повышения риска инфекционных осложнений. Возможно, это связано с тем, что уровень иммуноглобулинов в сыворотке не меняется. Ртикусимаб имеет высокую самостоятельную (без химиотерапии) активность в I-й линии лечения CD20-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомы.

В случае фолликулярной лимфомы частота ответа оставляет 70–75 %, при лимфоме мантийной зоны — 35–40 %. Между тем, частота полного эффекта составляет 10–40 %. С учётом реальной нетоксичности лечения ритуксимаба часто применяется самостоятельно у больных в плохом общем состоянии. В остальных случаях наиболее рациональным применением является сочетание ритуксимаба и химиотерапии. Рациональные режимы такого сочетания иммуно- и химиотерапии продолжают изучаться.

Показаниями для назначения ритуксимаба является $CD20^+$ неходжкинская лимфома высокой или низкой степени дифференцировки, рефрактерная и рецидивирующая. Ритуксимаб может применяться вместо химиотерапии (у тяжёлых больных) или для поддержания ремиссии после успешной химиотерапии.

Несмотря на значительный самостоятельный успех ритуксимаба, существует проблема ограниченной эффективности терапии у больных с агрессивными формами лимфомы. Половина больных с рецидивирующими лимфомами и 2/3 больных с рецидивирующими агрессивными лимфомами не достигают значительной ремиссии при использовании ритуксимаба. Новые возможности открывает использование радиоиммунотоксинов на основе антител анти-CD20. Два препарата на основе моноклональных антител к CD20-антигену, меченные радиоактивными изотопами, разрешены к клиническому применению при неходжкинской лимфоме.

Ибритумомаб (Зевалин) является конъюгатом Мабтеры с радиоактивным изотопом иттрия-90 (Y90). Показаниями к использованию Зевалина является рецидивирующия и рефрактерная неходжкинская лимфома низкой степени злокачественности, в том числе и при прогрессировании после Мабтеры.

Бексар (I131 Tositumomab, Bexxar) — конъюгат мышиного моноклонального антитела анти-CD20 с радиоактивным изотопом йода ^{131}I. Показана высокая эффективность Бексара в I-й линии лечения при неходжкинской $CD20^+$ лимфоме.

В настоящее время, несмотря на значительный эффект, считается неэтичным применение радиоизотопных препаратов в I линии. Аргументом является отсутствие достаточного преимущества в длительности ремиссии по сравнению с неизотопными лекарствами, риск инфекционных и геморрагических осложнений при нейтропениях и тромбоцитопениях IV степени, а также повышенный риск развития других злокачественных опухолей.

Недавно было показано, что герцептин (трастузумаб) — гуманизированное моноклональное антитело, имеющее своей мишенью рецептор онкогена HER-2/neu, гиперэкспрессированного в некоторых клетках рака молочной железы, обладает противоопухолевой активностью при этой форме рака и увеличивает эффект применения комбинированной химиотерапии у больных с опухолями $HER2/neu^+$.

11.9. Ретиноиды

К препаратам, обладающим свойством усиливать дифференцировку клеток, относятся ретиноиды (рис. 11.23). Третиноин (all trans retinoic acid) индуцирует про-

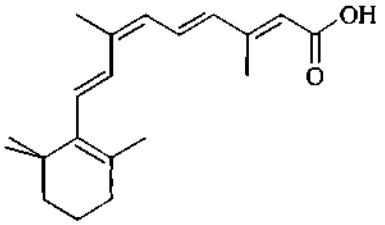


Рис. 11.23. Химическая структура третиноина

цессы дифференциации и тормозит пролиферацию промиелоцитов, обусловленную нарушением связывания третиноина с ядерными рецепторами ретиноевой кислоты. Активирует начальное созревание примитивных промиелоцитов, происходящих из лейкемического клона, и их замещение в костном мозге и периферической крови нормальными поликлоновыми гемопоэтическими клетками, т. е. приводит к ремиссии. Продолжительность ремиссии составляет в среднем 2–4 месяцев. Используется при лечении острого промиелоцитного лейкоза.

11.10. Ингибиторы ангиогенеза

Препараты группы ингибиторов ангиогенеза относятся к потенциально противоопухолевым средствам в связи с их способностью нарушать образование новых сосудов в опухоли. Ангиогенез — необходимый этап формирования опухоли, который способствует её инвазии в окружающие ткани. Новые сосуды необходимы для питания клеток растущей опухоли, они также являются одним из путей метастазирования. Считается, что если устранить и прекратить формирование новых кровеносных сосудов в опухоли, то она будет не способна к дальнейшему росту и распространению. Таким образом, использование ингибиторов ангиогенеза позволяет ограничить размер опухоли или даже вызвать уменьшение её размеров, а также предотвращает метастазирование опухоли гематогенным путём. В настоящее время в качестве ингибиторов ангиогенеза за рубежом уже используется нексовар.

11.11. Другие препараты для терапии опухолей

Другие препараты для терапии опухолей (рис. 11.24). Для лечения опухолей используется ряд препаратов, которые обычно не воспринимаются как «химиотерапия». В то время как действие препаратов, используемых для химиотерапии, основано на поражении активно пролиферирующих клеток, действие других препаратов основано на иных свойствах, отличающих опухолевые клетки от нормальных. Обычно эти препараты вызывают менее серьёзные побочные эффекты, чем обычная химиотерапия.

По мере того как исследователи получают новые данные о процессах, поисходящих в опухолевых клетках, они разрабатывают препараты, поражающие опухолевые клетки более избирательно, чем стандартные химиотерапевтические препараты. Большинство из них воздействуют на клетки с мутациями в определённых генах, или на клетки, экспрессирующие слишком много копий этих генов.

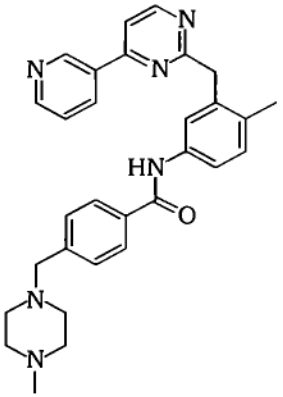


Рис. 11.24. Химическая структура иматиниба

В настоящее время доступны лишь несколько таких препаратов. К ним относятся сорафениб, иматиниб, гефитиниб и эрлотиниб.

Сорафениб — ингибитор ферментов из группы киназ. Ингибирование размножения опухолевых клеток сопровождается уменьшением ангиогенеза в опухолевой ткани; показания — метастатический почечно-клеточный рак и печёночно-клеточный рак.

Иматиниб представляет собой противоопухолевый препарат, ингибитор протеинтирозинкиназы (Bcr-Abl тирозинкиназы) — аномального фермента, продуцируемого филадельфийской хромосомой при хроническом миелолейкозе. Подавляет пролиферацию Bcr-Abl-позитивных опухолевых клеток, индуцирует их апоптоз. Не обладает селективностью; *in vitro* подавляет также рецепторы тирозинкиназы тромбоцитарного фактора роста и фактора стволовых клеток. Кроме того, иматиниб является селективным блокатором мутантных форм киназных рецепторов KIT и PDGF, экспрессируемых в гастроинтестинальных опухолях. Таким образом, иматиниб применяют для лечения хронических миелолейкозов, а также ряда гастроинтестинальных опухолей.

Гефитиниб (рис. 11.25) — селективный ингибитор тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), экспрессия которых наблюдается во многих

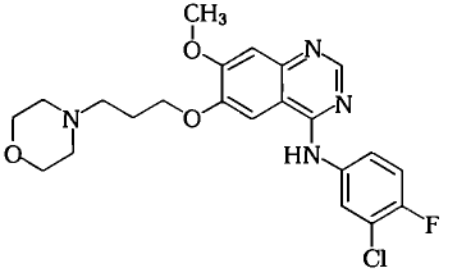


Рис. 11.25. Химическая структура гефитиниба

солидных опухолях; препарат тормозит рост различных линий опухолевых клеток человека, метастазирование и ангиогенез, а также ускоряет апоптоз опухолевых клеток, повышает противоопухолевую активность химиотерапевтических препаратов, лучевой и гормональной терапии. Иресса применяется для лечения местно-распространённого или метастатического немелкоклеточного рака лёгкого, рефрактерного

к режимам химиотерапии, содержащим производные платины и доцетаксел. Сходной с гефитинибом структурой и спектром клинической активности обладает препарат эрлотиниб (Тарцева).

11.12. Перспективы применения таргетной терапии при раке почек и печени

По уровню заболеваемости среди злокачественных новообразований рак почки занимает 10-е место, но по уровню прироста уступает только раку предстательной железы [1].

До настоящего времени наиболее эффективным методом лечения почечно-клеточного рака была хирургия [2]. Однако её использование при диссеминированных формах заболевания имеет достаточно узкие показания, которые, как правило, ограничиваются паллиативной нефрэктомией [3, 4] и удалением солитарных метастазов различных локализаций [5].

Трудность химиотерапии рака почек определяется гиперэкспрессией в опухолевых клетках гена множественной лекарственной устойчивости MDR-1, кодирующего мембранный гликопротеин Р-170, который удаляет из клетки цитостатики. При использовании обычных цитостатиков средняя частота достижения объективного ответа на лечение препаратами составляет 4 % (от 0 % до 6,4 %) [6–8].

Несколько лучшие результаты иногда достигались иммунотерапией с использованием интерферона-2-α (ИФН-α) и интерлейкина-2 (ИЛ-2). Объективный ответ на терапию интерфероном-α отмечали в 10–20 % случаев, при частоте полных эффектов 2 % [9].

В 2002 г. Motzler и др., проанализировав результаты лечения 463 больных интерфероном-α, выявили факторы неблагоприятного прогноза, к которым были отнесены соматический статус (< 80 % по шкале Карновского), высокий уровень лактатдегидрогеназы (1,5 раза выше нормы), гиперкальциемия (концентрация кальция > 10 мг/дл), анемия (гемоглобин <13 г/дл) и время от первичного диагноза до начала системного лечения (< 1 года). На основании полученных результатов была разработана прогностическая модель MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), выделяющая группу плохого (более 3 факторов риска, медиана выживаемости 6 месяцев), умеренного (1–2 фактора риска, медиана выживаемости 14 месяцев) и благоприятного прогноза.

Было проказано, что стандартная терапия цитокинами высокоэффективна в группе хорошего прогноза (0 факторов риска, медиана выживаемости 30 месяцев), малоэффективна среди пациентов с умеренным и неэффективна у больных с плохим прогнозом: соматический статус (< 80 % по шкале Карновского), высокий уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ>1,5 раза нормы), гиперкальциемия (концентрация скорректированного кальция > 10 мг/дл), анемия (гемоглобин < 13 г/дл) и время от первичного диагноза до начала системного лечения < 1 года [10].

Общая эффективность лечения интерлейкином-2 в дозе 600 000–720 000 МЕ/кг в виде 15-минутных внутривенных инфузий каждые 8 ч в течение 5 дней (аналогичный цикл повторялся через 5–9 дней; интервал между курсами — 1,5–2,5 месяца) составила 15 % при частоте полных и частичных ремиссий 7 % и 8 % соответственно [11].

Заметного успеха не было достигнуто при комбинации ИНФ и ИЛ-2, а также в результате сочетанного использования цитокинов и цитостатических препаратов [12, 13].

По этой причине современная онкология нуждается в принципиально новых фармакологических средствах для лечения неоперабельного местно-распространённого и диссеминированного почечно-клеточного рака.

К таким средствам можно отнести препарат для таргетной (целевой) терапии Нексавар (сорафениб), который действует как ингибитор ангиогенеза через подавление сигнальных путей (C-Raf, VEGF-R, PDGF-R, c-kit и Flt-3), определяющих патологическую пролиферацию раковых клеток. Активация сигнального пути Ras-Raf-MEK-ERK играет важную роль в процессах клеточного роста и пролиферации. Патологические изменения белков RAS и RAF приводят к гиперактивации митогенактивируемой протеинкиназы (MEK), а также внеклеточной сигналпередающей киназы (ERK) и, как следствие, нарушению роста клетки и её митотической активности [14]. Сорафениб связывает Raf, блокируя киназную активность за счёт поддержания её в виде неактивной конфигурации. Это приводит к снижению активации ERK, блокаде роста и пролиферации опухолевых клеток [15]. Кроме того, сорафениб способен ингибировать киназную активность рецепторов эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), ответственных за ангиогенез, без которого невозможен рост опухоли. Ингибируя киназную активность рецепторов VEGFR-2 и VEGFR-3, а также PDGFR-b, c-KIT и Flt-3, сорафениб подавляет ключевые этапы ангиогенеза, такие как дифференцировка, пролиферация, миграция эндотелиоцитов [16]. Способность сорафениба ингибировать тирозинкиназнуй активность рецепторов VEGFR и PDGFR, а также серин/треонинкиназую активность рецепторов RAF-MEK-ERK продемонстрирована в биохимических исследованиях *in vitro* [16, 17].

Антиангиогенное действие сорафениба (Нексавар) подтверждено на этапе доклинических испытаний при нескольких видах опухоли человека, в том числе раке почки [18].

Нексавар стал первым препаратом, одобренным FDA в качестве лекарственного средства против рака почки, за последние 14 лет. Препарат для перорального приёма был одобрен в декабре 2005 г. Основой для этого стали обширные клинические исследования, проведённые на 903 больных почечно-клеточным раком, которые были разделены случайным образом на группы лечения и плацебо [19]. Несмотря на то, что в группе лечение наблюдался только один случай полного ответа, стабилизация наблюдалась в 74% по сравнению с 53% в группе плацебо, а прогрессия опухоли только в 12% при приёме Нексавара по сравнению с 37% в группе плацебо. При анализе выживаемости без прогрессии показано преимущество Нексавара (медиана 24 недели) по сравнению с плацебо (12 недель, $p < 0{,}00001$).

Преимущество сорафениба в выживаемости без признаков прогрессирования по сравнению с пациентами, которым назначали плацебо, сохранялось во всех подгруппах, независимо от возраста, соматического статуса, прогностической группы MSKCC, предшествующей терапии по поводу метастазов, ранее проводившегося лечения цитокинами, от времени выявления рака почки, наличия метастазов в печени и лёгких [19].

Проведённый анализ указал на необходимость радикально изменить данное исследование и пациентам, ранее рандомизированным в группу плацебо, назначить сорафениб. Дополнительный анализ, включивший оценку общей выживаемости через 6 месяцев после перевода пациентов, получавших плацебо, в группу терапии сорафенибом, выявил преимущество общей выживаемости среди больных, рандомизированных на сорафениб, по сравнению с плацебо (19,3 и 15,9 месяца соответственно) [20].

В III фазе сорафениб также продемонстрировал удовлетворительный профиль толерантности при хорошей управляемости побочных эффектов. Большинство проявлений токсичности имели 1-ю и 2-ю степени тяжести и включали гипертензию,

слабость, гастроинтестинальные, дерматологические и неврологические симптомы. Гематологические и биохимические отклонения 3-й и 4-й степени на фоне терапии сорафенибом развились только у 2% пациентов. Частота прерывания терапии в исследовании III-й фазы составила 10%, что сравнимо с 8% в группе плацебо.

Препарат относительно малотоксичен. Наибольшими токсическими проявлениями были сыпь (40% по сравнению с 16%), диарея (43% и 13%) и реакция кожи (30% и 7%). Токсические эффекты 3-й степени были обнаружены менее чем у 11% больных, принимающих Нексавар.

Хороший профиль переносимости Нексавара указывает на возможность его комбинации с другими препаратами, в том числе с высокой цитотоскичностью, которые потенциально могут повысить противоопухолевый эффект [21]. В двух исследованиях оценивается роль дополнительного назначения сорафениба к терапии интерфероном-α у ранее не леченных пациентов с диссеминированным раком почки. В протокол Gollob и др. включён 31 пациент с метастатическим почечно-клеточным раком, не получавший предшествующего лечения. Терапия включает 8-недельные курсы сорафениба в дозе 400 мг 2 раза в сутки *per os* в сочетании с интерфероном-α 10 млн ЕД 3 раза в неделю. Среди 24 пациентов, у которых возможна оценка эффекта, частота объективных ответов по критериям RECIST составила 42% (частичная регрессия — 38%, полная регрессия — 4%). Стабилизация опухолевого процесса после завершения, по крайней мере, одного лечебного цикла достигнута в 46% наблюдений. В большинстве случаев проявления токсичности имели 1-ю и 2-ю степени тяжести и включали: слабость (78%), анорексию (74%), сыпь (70%; 3-ю степень — 11%), диарею (67%), снижение массы тела (63%), гипофосфатемию (59%; 3 степень — 33%), тошноту (56%), нейтропению (48%; 3 степень — 19%), алопецию (44%) и стоматит (26%) [22].

В исследовании SWOG также оценивалась эффективность комбинации сорафениба и интерферона-α у 58 ранее не леченных больных диссеминированным раком почки. Режим лечения аналогичен таковому в протоколе Gollob и др. Частота ответов на лечение составила 19%. Проявления токсичности зарегистрированы у 50% больных [23]. Данные исследования демонстрируют возможность использования комбинированной терапии сорафенибом и цитокинами. Для подтверждения преимуществ подобной комбинации перед монотерапией необходимо её дальнейшее изучение.

Другим типом рака, в лечении которого до настоящего времени были огромные трудности, является гепатоцеллюлярная карцинома — самая распространённая форма рака печени, которая встречается у 90% взрослых со злокачественными опухолями печени. Рак печени занимает шестое место по частоте онкологических заболеваний и третье место среди случаев смертности среди онкологических пациентов в мире. Каждый год регистрируется более 600 000 случаев рака печени по всему миру (более 400 000 случаев в Китае, Южной Корее, Японии, Тайвани, 54 000 в Европейском Союзе и 15 000 в Соединённых Штатах), при этом частота заболевания растёт.

В 2002 г. около 600 000 человек умерло от рака печени, включая около 370 000 смертей в Китае, Южной Корее и Японии, 57 000 смертей в Европейском Союзе и 13 000 в США.

Медицинский журнал Новой Англии опубликовал убедительные результаты исследования применения Нексавара при лечении рака печени [24]. В рамках международного рандомизированного плацебо-контролируемого исследования III-й фазы для оценки сорафениба при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) были подвергнуты анализу 602 больных раком печени, не получавших предварительной системной терапии. Основная цель исследования заключалась в сравнении общей выживаемости и времени наступления симптоматических улучшений пациентов, получавших Нексавар, и тех, кто получали плацебо. Вторичные цели исследования состояли

в изучении показателя общего ответа, уровня контроля заболевания и безопасности препарата.

Медиана общей выживаемости в группе Нексавара составила 10,7 месяцев, тогда как в группе плацебо этот показатель был равен 7,9 месяцев (HR = 0,69; $p = 0{,}0006$). При этом не было зафиксировано различий между группами по времени наступления симптоматических улучшений [24].

Для сравнения этого показателя использовался вопросник, заполняемый самими пациентами. Медиана беспрогрессивной выживаемости в группе Нексавара составила 5,5 месяцев, тогда как в группе плацебо этот показатель был равен 2,8 месяцев (HR = 0,58; $p \leqslant 0{,}001$). Между группами, получавшими Нексавар и плацебо, не отмечалось существенных различий в отношении серьёзных нежелательных явлений; наиболее частыми нежелательными явлениями, которые наблюдались у пациентов на фоне лечения Нексаваром, были диарея и кожная реакция ладоней и ступней.

Результаты исследования III-й фазы показали, что абсолютный риск летального исхода у пациентов, которые получали таблетки Нексавара (сорафениб), на 31% ниже, чем у больных неоперабельной гепатоцеллюлярной карциномой (или раком печени), которые получали плацебо.

Это также означает увеличение медианы общей выживаемости на 44% у пациентов, получавших Нексавар. На основе этих впечатляющих результатов в 2007 г. Нексавар был одобрен к применению для лечения ГЦК в США и Европе.

В настоящее время международными исследовательскими группами, правительственными учреждениями, фармацевтическими компаниями и независимыми учёными проводятся клинические исследования для оценки применения Нексавара в монотерапии или в составе комбинированных схем при целом ряде других видов онкологических заболеваний, включая адъювантную терапию рака почки, метастатической меланомы, рака молочной железы и немелкоклеточного рака лёгкого.

Таким образом, сорафениб — мультикиназный ингибитор, действует на различных клеточных уровнях и подавляет пролиферацию опухолевых клеток и васкуляризацию (рост сосудов) опухоли — два важных процесса, которые обеспечивают рост злокачественной опухоли. Имеются как научные обоснования, так и клинические доказательства для его назначения больным неоперабельным местно-распространённым и диссеминированным раком почки групп хорошего и умеренного прогноза MSKCC в качестве первой линии терапии, второй линии лечения при опухолях, рефрактерных к цитокинам, а также при раке печени. На данный момент одобрен в более 40 странах с показанием лечения рака печени и более, чем в 70 странах, применяется для лечения рака почек. В Европе Нексавар утверждён для лечения гепатоцеллюлярной карциномы и для лечения пациентов с прогрессирующей карциномой почек, которым не помогла терапия интерфероном-α или интерлейкином-2, или же пациентов, которым подобная терапия не подходит. Нексавар также имеет большой потенциал как препарат монотерапии или комплексного лечения других форм рака, включая метастатическую меланому, рак лёгких, рак молочной железы.

11.13. Перспективы создания новых противоопухолевых средств

Активные работы последних лет, посвящённые переносу результатов фундаментальных исследований по биологии опухолей в клинику (так называемые трансляционные исследования), существенно расширили возможности терапии онкологических больных. Использование цитокинов (интерлейкинов и интерферонов) с терапевтической целью, применение колониестимулирующих факторов для защиты кроветво-

рения при лечении цитостатиками, введение в практику моноклональных антител и дифференцирующих агентов — это реальные достижения последнего десятилетия.

Не потеряло своего значения использование ряда известных иммуномодуляторов (внутрипузырное введение БЦЖ при раке мочевого пузыря, применение левамизола в комбинированной адъювантной терапии рака толстой кишки). Большие надежды на расширение возможностей иммунотерапии опухолей возлагаются на развитие «генной терапии», построенной на использовании технологии переноса специфических генов, например гена ИЛ-2, либо в клетки организма для улучшения переносимости цитостатиков или усиления противоопухолевого иммунитета, либо в клетки опухоли с целью повышения их чувствительности к цитостатикам, коррекции генных альтераций или усиления их иммуногенности. В настоящее время в создании так называемых противораковых вакцин на основе генотерапии используются:

— цитокины и их рецепторы,
— опухолевоассоциированные антигены,
— «суицидные гены»,
— супрессоры иммунокомпетентных клеток,
— чужеродные антигены.

Наиболее оптимистические клинические данные получены с двумя первыми типами вакцин.

Другим перспективным направлением в создании противораковых вакцин является использование дендритных клеток, которые презентируют опухолевоассоциированный антиген иммунокомпетентным клеткам; последние, в свою очередь, направленно уничтожают опухолевые клетки.

11.13.1. Ингибиторы деацетилазы гистонов. Это класс противоопухолевых препаратов, представители которого на данный момент проходят клинические испытания для лечения лейкозов, опухолей молочной и предстательной железы и др. (рис. 11.26, цветная вклейка). Деацетилаза гистонов (HDAC) — фермент, контролирующий структуру и уровень компактизации ДНК. Активность HDAC связана с модификацией ДНК, приводящей к усилению интенсивности роста и пролиферации опухолевых клеток.

Ингибиторы HDAC позволяют клетке запустить экспрессию критических генов, что приводит к апоптозу. Активация апоптоза приводит к угнетению пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, ингибиторы HDAC представляют собой не просто цитотоксические агенты, убивающие все активно делящиеся клетки, они способны селективно воздействовать исключительно на опухолевые клетки.

11.13.2. Препараты генонаправленного действия (генная терапия). Среди существующих методов лечения генная терапия считается наиболее перспективным методом, поскольку позволяет с высокой избирательностью встраивать в «больные» соматические клетки организма генетические конструкции, способные восстанавливать функции повреждённых генов (позитивная генная терапия) или же, наоборот, блокировать их аномальное действие либо гиперэкспрессию (негативная генная терапия). В зависимости от способа введения больному генетических конструкций различают:

1) собственно генную терапию, когда генетические дефекты компенсируют переносом рекомбинантной ДНК в клетки *in vivo*;

2) генно-клеточную терапию, при которой осуществляют трансфекцию ДНК *ex vivo* (клетки извлекают из организма, в них встраивают нужный ген и после культивирования *in vitro* клетки вновь возвращают реципиенту);

3) клеточную терапию, основанную на подсадке больному нормальных клеток, экспрессирующих ген, необходимый для лечения.

Для переноса генов в клетки разработаны различные подходы, а именно трансфекция путём преципитации фосфатом кальция, липофекция, электропорация, микроинъекция, «генное ружьё» и др. Пока наиболее эффективной системой переноса рекомбинантной ДНК являются вирусные векторы. С этой целью используют РНК- или ДНК-содержащие вирусы, не способные к репликации в клетках-мишенях. Ретровирусные векторы, в том числе на основе вируса лейкоза мышей Молони и вируса саркомы мышей Харви, были разработаны одними из первых. Поскольку встраивание ретровирусных векторов в клеточный геном может инициировать инсерционный мутагенез, существует потенциальная опасность развития опухолевого процесса.

В последнее время были разработаны вирусные векторы, обладающие уникальной способностью проникать в покоящиеся клетки, такие как, например, нейроны. Из ДНК-содержащих векторов в генной терапии наиболее часто используют аденовирусные векторы, которые инфицируют как активно пролиферирующие, так и медленно делящиеся клетки, а также стабильные *in vivo*. Благодаря размеру генома аденовируса в такие векторы можно встраивать бóльшие генетические конструкции, чем в случае векторов, основанных на использовании РНК-содержащих вирусов. Весьма перспективными для генной терапии рака могут оказаться α-вирусные векторы, в частности основанные на репликоне вируса леса Семлики (SFV). Быстрая продукция рекомбинантных вирусных частиц и их высокий титр обеспечивают высокую эффективность трансфекции клеточных культур и клеток-мишеней *in vivo*. Кроме того, SFV-векторы вызывают апоптоз инфицированных клеток, что повышает их противоопухолевую активность.

11.14. Расширение возможностей использования бисфосфонатов для профилактики и лечения костных осложнений при злокачественном метастазировании

При различных онкологических заболеваниях, например при раке молочной железы, простаты, почек, щитовидной железы, раке лёгких, часто вследствие метастазирования поражается костная система. Костные метастазы сопровождаются болями, патологическими переломами, гиперкальциемией и сдавлением костного мозга, что приводит не только к ухудшению качества жизни больного но и существенному сокращению продолжительности жизни. Из 700 000 человек с онкологическими заболеваниями около 500 000 имеют метастазы в кости.

На ранних стадиях костного метастазирования кость разрушается не клетками опухоли, а остеокластами, которые активируются путём паракринной секреции метастатическими клетками опухоли некоторых веществ, в первую очередь пептидами, имеющими сходство с паратиреоидным гормоном (PTHrP). Именно опухоли, метастазирующие в костную ткань, вырабатывают данные пептиды.

Когда раковые клетки колонизируют костный мозг, они могут секретировать факторы, которые ингибируют пролиферацию нормальных остеобластов человека и клеток, похожих на остеобласты, и усиливают ответ вторичных мессенджеров этих клеток на остеолитические сигналы.

Пептиды PTHrP и другие факторы, стимулируя остеокластную резорбцию кости, приводят к освобождению продуктов деградации костного матрикса, имеющих хемотаксичность для клеток опухоли. Опухольассоциированные факторы, такие как фактор роста тромбоцитов-α, могут также увеличивать действие PTHrP на органы и на рост раковых клеток.

Таким образом, многочисленные факторы, вызывающие паракринную активацию остеокластов, приводят к деградации минерализированного матрикса кости.

Факторы роста и цитокины (например, инсулиноподобный фактор роста, фактор роста тромбоцитов, трансформирующий фактор роста-α), которые синтезируются или накапливаются в кости, способны стимулировать пролиферативные процессы в микрометастазах. Этот самоподдерживающий цикл межклеточных взаимодействий и определяет характер опухолевого остеолизиса.

Следовательно, опухольиндуцированный остеолизис можно лечить и/или предупреждать как путём прямого воздействия на клетки, разрушающие кость, так и с помощью подавления стимулирования опухолью остеолизиса костных клеток. Поиск фармакологических веществ, способных влиять на эти процессы, привёл к созданию бисфосфонатов, которые всё шире применяются в клинике с целью регуляции костного метаболизма. Биосфосфонаты представляют собой аналоги полифосфатов и подобно им, прочно связываются с гидроксиапатитом на поверхности кости. В отличие от пирофосфатов, которые быстро расщепляются гидролитическими ферментами остеокластов, бисфосфонаты, у которых атом углерода заменён кислородом, стабильны и ослабляют активность остеокластов с помощью различных механизмов, которые включают измененеия цитосклета, ферментативной активности и апоптоз. В условиях *in vitro* они подавляют преципитацию фосфата кальция, блокируя его превращение в гидроксиапатит, предотвращая агрегацию кристаллов апатита в большие кристаллы и замедляя растворение этих кристаллов. Бисфосфонаты накапливаются предпочтительно в местах активной перестройки кости. Они действуют прямо на зрелые остеокласты, уменьшая их остеорезорбтивную активность путём снижения вытеснения из матрикса H^+ и Ca^{2+} и модификации активности различных ферментов. Выраженный антирезорбтивный эффект бисфосфонатов и является фармакологическим обоснованием лечения опухолевого остеолизиса. В то же время в последнее время появились данные, свидетельствующие о способности бисфосфонатов предотвращать появление костных метастазов, оказывать прямой противоопухолевый эффект, а также уменьшать болевую чувствительность при опухолях, что может увеличить сферу их практического использования. По химическому строение все бисфосфонаты разделяют на азотсодержащие (памидронат, ибандронат, золедронат, алендронат) и азотнесодержащие (этидронат и клодронат). Между бисфосфонатами имеются также различия и в спектре их фармакологической активности и показаниям (табл. 11.3.).

Первым бисфосфонатом, для которого было показана антиостеолитическая активность, был этидронат. Этот бисфосфонат уменьшает величину опухолевого остеолизиса и увеличивает выживаемость мышей с раком мочевого пузыря. Однако авторы отметили, что этидронат обладает относительно слабым эффектом и, кроме того, нарушает процесс минерализации. В дальнейшем B. Krempien и C. Manegold сообщили об остеопротективном эффекте вновь синтезированного бисфосфоната клодроната на модели саркомы Уолкера 256. Введение клодроната значительно снижало деструкцию кости. Причём, чем длительнее было введение клодроната, тем сильнее была защита костей от деструкции. В дальнейшем были синтезированы аминобисфонаты (памидронат, алендронат, ибандронант, золедронат и др), которые в условиях *in vitro* у мышей и *in vivo* у крыс ещё сильнее ингибировали резорбцию кости. Данный эффект повышался при удлинении алифатической угеводородной и азотсодержащей боковых цепей бисфосфонатов. Однако в терапевтических дозах клодронат (800 мг) и алендронат (10 мг) в равной степени снижали остеопороз и частоту переломов позвоночника. Также равноэффективны были памидронат (90 мг) и золедронат (4 мг). При этом важно подчеркнуть, что более низкие дозы азотсодержащих бисфосфонатов последнего поколения (золедронат) не улучшает переносимости лечения бисфосфонатами. В частности, имеются сообщения о повышении риска гипокальциемии

Таблица 11.3

Современные бисфосфонаты, разрешённые к применению в РФ

Международное непатентованное название	Торговое название (лекарственная форма, производитель)	Показание к применению при онкологических заболеваниях
Этидроновая кислота	Ксидифон (концентрат для приготовления раствора для приёма внутрь 200 мг/мл 100 мл, Мосхимфармпрепараты ФГУП им. Н. А. Семашко — Россия)	Гиперкальциемия при неопластических болезнях
Клодроновая кислота	Бонефос (концентрат для приготовления раствора для инфузий 60 мг/мл 5 мл, ампулы, капсулы 400 мг 100 шт., таблетки по 800 мг 60 шт., Шеринг Ой, дочернее предприятие Шеринг А. Г., Германия)	Остеолиз при метастазах злокачественных опухолей в кости и миеломной болезни (множественной миеломе). Профилактика развития костных метастазов первичного рака молочной железы. Гиперкальциемия, обусловленная злокачественными опухолями
Памидроновая кислота	Аредиа (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 15 мг, 3 0 мг, флаконы, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 60 мг, 90 мг, Новартис Фарма АГ — Швейцария)	Метастазы в кости (преимущественно остеолитического характера), миеломная болезнь; гиперкальциемия, обусловленная злокачественными опухолями (эпидермоидного и неиэпидермоидного происхождения, без и с костными метастазами)
Алендроновая кислота	Фосамакс (таблетки 70 мг, 4 шт., таблетки 10 мг, 14 шт., Мерк Шарп и Доум Б. В. — Нидерланды)	Гиперкальциемия при злокачественных опухолях
Ибандроновая кислота	Бондронат (концентрат для приготовления раствора для инфузий 1 мг/мл, 1 мл, 2 мл, Ф. Хоффманн–Ля Рош Лтд [Швейцария], произведено Рош Диагностикс ГмбХ — Германия)	Гиперкальциемия при злокачественных новообразованиях (в том числе с метастазами)
Золедроновая кислота	Зомета (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 4 мг, флаконы, Новартис Фарма АГ — Швейцария)	Остеолитические, остеосклеротические и смешанные костные метастазы солидных опухолей; остеолитические очаги при множественной миеломе (в составе комбинированной терапии). Гиперкальциемия, вызванная злокачественной опухолью

и увеличении частоты возникновения воспалительных заболеваний органов зрения при их использовании.

Клодронат, в отличие от этидроната и памидроната, не вызывает нарушения процессов минерализации костной ткани, накопления некальцифицированных остео-

идов и ингибирования кальцификации хрящевого матрикса. У крыс с хроническим артритом клодронат и аледронат в равной степени ингибировали снижение костной массы, вызванной этой патологией, но только клодронат уменьшал воспалительную реакцию и местную деформацию кости. Исследования на клеточных линиях подтвердили, что цитотоксическое действие клодроната на макрофаги и остеокласты достигается путём индукции процессов апоптоза. Интересно, что между разными бисфосфонатами есть различия в механизме развития апоптоза. Клодронат индуцирует апоптотическую гибель клеток, превращаясь в негидролизуемый аналог АТФ — аденозин-5′-(β,γ-дихлорметилен)трифосфат, который цитотоксичен для макрофагов и остеокластов. В случае аминобисфосфонатов апоптоз, видимо, обусловлен ингибированием метаболизма мевалоновой кислоты, которая важна для поддержания целостности клеточной мембраны, что указывает на различие биохимических механизмов апоптотического действия этих препаратов на остеокласты. При использовании клодроната апоптотический эффект имел место в терапевтических дозах, а при использовании памидроната — только во много более высоких (токсических) дозах.

Бисфосфонаты не только могут подавлять рост клеток опухоли и вызывать их апоптоз, но и регулировать экспрессию некоторых типов мРНК, которые опосредует синтез факторов, регулирующих остеокласты. В частности, клодронат и памидронат дозозависимым образом ингибирорвали экспрессию мРНК для остеопонтина и лиганда рецептора, активирующего дифференциацию NF-$\varkappa$ в клетках остеосаркомы UMR 106–01.

Кроме того, показано, что бисфосфонаты могут изменять адгезивные свойства клеток опухоли к поверхности кости. Van der Pluijm и др. показали, что после инкубации с клодронатом или ибандронатом кусочки костной ткани становились устойчивыми к адгезии опухолевых клеток. В исследовании S. Boissier и др. выявлено выраженное снижение адгезивных свойств культуры клеток рака молочной железы и простаты в присутствии бисфосфонатов. Таким образом, представленные материалы свидетельствуют о возможности использования бисфосфонатов как для ингибирования патологического остеолиза, особенно часто встречающегося при злокачественных новообразованиях, имеющих склонность к метастазированию в кости, так и в качестве химиотерапевтических противоопухолевых препаратов, способных угнетать метастазирование.

Кроме того, недавно были выявлены дополнительные фармакологические эффекты бисфосфонатов, которые могут быть полезны при их клиническом применении. В частности, в исследованиях *in vivo* на животных было продемонстрировано, что клодронат обладает сильным ингибирующим влиянием на развитие атеросклероза путём уменьшения накопления кальция в сосудистой стенке и/или холестерина. Другим полезным дополнительным эффектом некоторых бисфосфонатов является их прямая анальгетическая активность. Bonabello A. и др. показали, что внутривенное введение мышам клодроната и памидроната, в отличие от алендроната или этидроната, приводит к развитию дозозависимого анальгетического эффекта (определяли по тесту отдёргивания хвоста). Анальгетическая активность клодроната и памидроната также имела место после их введения в желудочки головного мозга. Эти результаты свидетельствуют о способности данных бисфосфаонтатов оказывать центральный и периферический обезболивающий эффект, что весьма важно при использовании бисфосфонатов у больных с опухолевыми заболеваниями, которые часто сопровождаются болевым синдромом.

Из представленных препаратов только клиническая эффективность этидроната не подтверждена результатами рандомизированных клинических испытаний, а в остальных случаях показания подтверждены доказательными исследованиями. При этом

следует отметить, что из приведённых бисфосфонатов наиболее полно изучен клодронат, эффективность которого доказана в многочисленных рандомизированных двойных слепых клинических исследованиях у больных с раком молочной железы, предстательной железы и множественной миеломой. Не случайно, что именно у клодроновой кислоты наиболее широко представлен спектр показаний, и только её рекомендуют как для лечения, так и для профилактики костного метастазирования.

Многочисленные клинические испытания, особенно на пациентах с метастазирующим раком молочной железы и множественной миеломой, показали способность бисфосфонатов устранять скелетные осложнения остеолитической костной болезни. Количество ожидаемых осложнений с помощью бисфосфонатов удалось уменьшить на 30–40%. Для субпопуляций пациентов с множественной миеломой и метастазирующим раком лёгких были получены данные о более долгой продолжительности жизни.

У пациентов с гиперкальциемиями, вызванными опухолями, лечение однократными (1500 мг) или многократными (5 × 300 мг) инфузиями клодроната (Бонефоса) приводило к быстрому снижению уровней кальция в сыворотке до нормальных.

Высокая антиостеолитическая эффективность Бонефоса, сопровождающаяся снижением случаев смертности, была выявлена у 173 пациентов с метастазами в костной ткани при проведении длительного, плацебо-контролируемого, рандомизированного и двойного слепого исследования.

Риск развития костных метастазов у больных с раком молочной железы можно уменьшить на 56%, а смертность — на 23%, если принимать Бонефос внутрь в дозе 1600 мг/день.

Важно отметить, что снижение частоты возникновения костных метастазов имеет место только во время приёма Бонефоса, а после его прекращения данный эффект не сохраняется. Имеются также и другие данные о снижении количества микрометастазов в костном мозге при приёме Бонефоса. Механизм данного эффекта Бонефоса может быть связан с его способностью избирательно действовать на костную ткань, ингибируя функцию остеокластов. Кроме того, Бонефос может оказывать действие на размер опухоли в костях благодаря локальному ингибированию выработки факторов роста — трансформирующего фактора роста-β или инсулиноподобного фактора роста, а также прямого действия на рост опухоли, вызывая апоптоз.

Важно отметить, что число пациентов с метастазами в костный мозг при приёме Бонефоса заметно меньше ($n = 5$), чем в контроле ($n = 21$). Селективность действия Бонефоста на костную ткань подтверждается отсутствием его влияния на частоту возникновения некостных метастазов (табл. 11.3).

При проведении мета-анализа в обзоре Кохрановского общества была подтверждена высокая эффективность клодроната для снижения костных осложнений при раке молочной железы. Согласно данным, приведённым в этом обзоре, пероральный приём клодроната женщинами с метастазирующим раком молочной железы снижает частоту костных осложнений на 16% ($p = 0{,}03$).

Таким образом, имеющиеся данные позволяют считать, что у больных с раком молочной железы клодронат значительно уменьшает частоту возникновения остеолитических осложнений — гиперкальциемии, переломов, болей, а также появления новых костных метастазов и микрометастазов в костном мозге. Продолжающиеся исследования указывают на возможность расширения использования бисфосфонатов и целесообразности их применения не только для профилактики и лечения злокачественного метастазирования в кость, но и при других патологических состояниях, характеризующихся резорбцией костной ткани, таких как остеопороз при терапии кортикостероидами или при менопаузе.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 11

1. *Аксель Е.М.* Заболеваемость злокачественными новообразованиями мочевых и мужских половых органов в России в 2003 г. // Онкоурология. 2005. № 1. С. 6–9.
2. *Adema A.D., Bijnsdorp I.V., Sandvold M.L. et al.* Innovations and opportunities to improve conventional (deoxy)nucleoside and fluoropyrimidine analogs in cancer // Curr. Med. Chem. 2009. V. 16. P. 4632–4643.
3. *Flanigan R.C., Salmon S.E., Blumenstein B.A. et al.* Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer // N. Engl. J. Med. 2001. V. 345. P. 1655–1659.
4. *Mickisch G.H., Garin A., van Poppel H. et al.* Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomized trial // Lancet. 2001. V. 358. P. 966–970.
5. *Flanigan R.C., Mickisch G., Sylvester R. et al.* Resection of metastatic renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol. 1998. V. 16. P. 2261–2266.
6. *Yagoda A., Petrylak D., Thompson S.* Cytotoxic chemotherapy for advanced renal cell carcinoma // Urol. Clin. N. Am. 1993. V. 20. P. 303.
7. *Kriegmair M., Oberneder R., Hofstetter A.* Interferon alfa and vinblastine versus medroxyprogesterone acetate in the treatment of metastatic renal cell carcinoma // Urology. 1995. V. 45. P. 458.
8. *Papac R.J., Keohane M.F.* Hormonal therapy for metastatic renal cell carcinoma combined androgent and prover followed by high dose tamoxifen // Eur. J. Cancer. 1993. V. 29A. P. 997.
9. *Savage P.D., Muss H.B.* Renal cell cancer. — Philadelphia: Lippincott Co., 1995. P. 373–387.
10. *Motzer R.J., Bacik J., Schwartz L.H. et al.* Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol. 2004. V. 22. P. 454–463.
11. *Fisher R.I., Rosenberg S.A., Sznol M. et al.* High-dose aldesleukin in renal cell carcinoma: long-term survival update // Cancer. J. Sci. Am. 1997. V. 3. P. 70–72.
12. *Negrier S., Escudier B., Lasset C. et al.* Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon-alpha-2a, or both in metastatic renal cell carcinoma // N. Engl. J. Med. 1998. V. 338. P. 1272–1278.
13. *Negrier S., Escudier B., Dovillard J.Y. et al.* Randomized study of interleukin-2 (IL-2) and interferon (IFN) with or without 5-FU (FUCY study) in metastatic renal cell carcinoma (MRCC) // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 1997. V. 16, № 32a. P. 1460–1468.
14. *Mercer K.E., Pritchard C.A.* Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1653. P. 25–40.
15. *Lyons J.F., Wilhelm S., Hibner B., Bollag G.* Discovery of a novel Raf kinase inhibitor // Endocr. Relat. Cancer. 2001. V. 8. P. 219–225.
16. *Wilhelm S.M., Carter C., Tang L. et al.* BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF / MEK / ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 7099–7109.
17. *Levy A.P., Paultoski N., Braun D. et al.* Analysis of transcription and protein expression changes in the 786-O human renal cell carcinoma tumor xenograft model in response to treatment with the multi-kinase inhibitor sorafenib (BAY 43–9006) // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2006. V. 47. P. 213–214.
18. *Chang Y.S., Adnane L., Henderson A. et al.* Sorafenib (BAY 43–9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor necrosis in the human RCC xenograft model, 786-O // Clin. Cancer. Res. 2005. V. 11. P. 9011S.

19. *Escudier B., Szczylik C., Eisen T. et al.* Randomized phase III trial of the multi-kinase inhibitor sorafenib (BAY 43–9006) in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC) // Eur. J. Cancer Suppl. 2005. V. 3. P. 226.
20. *Eisen T., Bukowski R.M., Staehler M. et al.* Randomized phase III trial of sorafenib in advanced renal cell carcinoma (RCC): Impact of crossover on survival [abstract] // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. Suppl. P. 4524. Abstract 4524.
21. *Escudier B., Szczylik C., Demkow T. et al.* Randomized phase II trial of the multi- kinase inhibitor sorafenib versus interferon (IFN) in treatment-naive patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) [abstract] // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. Suppl. P. 4501. Abstract 4501.
22. *Gollob J., Richmond T., Jones J. et al.* Phase II trial of sorafenib plus interferon-alpha 2b (IFN-α2b) as first- or second-line therapy in patients (pts) with metastatic renal cell cancer (RCC) [abstract] // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. Suppl. P. 4538. Abstract 4538.
23. *Ryan C. W., Goldman B.H., Lara P.N. et al.* Sorafenib plus interferon-a2b (IFN) as first-line therapy for advanced renal cell carcinoma (RCC): SWOG 0412 [abstract] // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. Suppl. P. 4525. Abstract 4525.
24. *Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V.* et al Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma // N. Engl. J. Med. 2008. V. 359. P. 378–390.

Глава 12

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Рассеянный склероз (РС) относится к демиелинизирующим заболеваниям, быстро приводящим к инвалидизации. Рассеянный склероз чаще всего имеет ремитирующую форму (до 80–85%) — когда обострение сменяется ремиссией. Реже имеет место прогредиентное течение РС, когда ухудшение состояния больного идёт с момента проявления заболевания. Наибольшую тревогу больных РС и их лечащих врачей вызывает нарастание инвалидизации, когда болезнь переходит в стадию вторично-прогрессирующего рассеянного склероза (ВПРС) [1]. При ВПРС инвалидизация становится основным фактором, определяющим необходимую помощь и соответствующие расходы. Ведущим механизмом развития демиелинизующего процесса при РС является иммунопатологический. В 1970-х гг. доминировала гипотеза о вирусной природе РС. Предполагалось, что вирус стимулирует продукцию Т-лимфоцитами интерферона-γ, который вызывает экзацербацию — обострение болезни, а интерферон-β тормозит репликацию вируса и поэтому тормозит этот процесс [16].

Для подтверждения гипотезы о возможном использовании интерферонов для лечения РС около 30 лет тому назад начались исследования, направленные на выявление терапевтической активности различных типов интерферонов. Результаты испытаний природного, или рекомбинантного, интерферона-α показали отсутствие у него способности оказывать лечебный эффект при РС. Аналогичные испытания интерферона-γ свидетельствовали даже об ухудшении состояния больных РС склерозом после его введения. И только в 1981 г. была опубликована первая работа (L. D. Jacobs и др.), согласно которой интратекальное введение дважды в неделю интерферона-β, выделенного из фибробластов человека ($1 \cdot 10^6$ ЕД/м^2), привело к уменьшению частоты обострений по сравнению с контрольной группой [5]. Эти результаты стимулировали проведение многочисленных исследований в области интерферонов, представляющих собой одну из групп межклеточных мессенджеров, называемых цитокинами. Они обладают антивирусной, антипролиферативной, противоопухолевой и иммуномодуляторной активностью. Система интерферонов является эволюционным приобретением позвоночных, начиная от рыб и кончая приматами, что предполагает очень древнее филогенетическое происхождение и существенное значение этой системы. Интерфероны были открыты при изучении механизма вирусной интерференции — феномена, при котором животные или клеточные культуры, заражённые одним вирусом, становились резистентными к инфекции другим вирусом. К настоящему времени установлено, что интерфероны можно отнести к гомеостатическим агентам. Обладая полифункциональными свойствами и участвуя в дифференцировке клеток, интерфероны играют существенную роль в патогенезе инфекционных, онкологических, аутоиммунных и других заболеваний. Имеется 2 типа интерферонов. К первому типу относятся интерфероны-α и -β, ко второму — интерферон-γ. Интерферон-α, обычно называемый лейкоцитарным, состоит из белков с молекулярной массой 19–24 кДа,

что соответствует 165–166 аминокислотам, продуцируется В-клетками и макрофагами после индукции вирусами, чужеродными нуклеиновыми кислотами, компонентами бактерий, гетерологическими клетками и некоторыми синтетическими индукторами. Интерферон-β — гликопротеин (166 аминокислот), продуцируемый клетками фиброэпителиального типа после индукции вирусами и чужеродными нуклеиновыми кислотами. Интерферон-γ — гликопротеин (45 кДа), состоит из двух мономеров. В отличие от интерферонов-α и -β, он не стабилен при pH ниже 4,0. Интерферон-γ продуцируется Т-лимфоцитами при стимуляции антигенами и митогенами. Гены, кодирующие интерфероны-α и -β, расположены у человека в 9-й хромосоме, сами интерфероны имеют 40–50% гомологии. Ген для интерферона-γ расположен в 12-й хромосоме, и интерферон-γ не имеет структурной гомологии с интерферонами-α и -β. Интерферон-γ и интерферон-β связываются с различными плазмамембранными рецепторами и вызывают фосфорилирование различных цитоплазматических белков — активаторов транскрипции. Иными словами, специфичность в действии различных интерферонов и других цитокинов (колониестимулирующий фактор, факторы роста, интерлейкины) определяется специфичностью активируемых ими киназ.

Фармакологическая активность интерферона-β-1б опосредована его связыванием с клеточными рецепторами 1-го типа. Эти рецепторы расположены на клеточной поверхности большинства клеток человека и состоят из двух субъединиц. Связывание интерферона-β с рецепторами запускает цепь внутриклеточных биохимических реакций: активацию киназ Janus (названы так благодаря присутствию в одной молекуле двух киназных доменов; они ассоциированы с рецепторами цитокинов, но неактивны, пока рецепторы не агрегируют под действием цитокинов). После агрегации происходит их активация за счёт трансфосфорилирования. Активированные киназы фосфорилируют множество тирозинов в цитоплазматической части рецепторов. К этим фосфотирозинам присоединяются молекулы белков, известных под общим названием белки STAT (signal transducers and activators of transcription), которые, димеризуясь, проникают в ядро. Там они сами или с участием других белковых факторов индуцируют транскрипцию тех генов, которые должны индуцироваться цитокином. В результате начинают функционировать механизмы противовирусной защиты, а также изменяется регуляция аутоиммунных процессов. В частности, интерферон-β быстро активирует кальцийнезависимую протеинкиназу С посредством вторичного посредника — диацилглицерина. Эта протеинкиназа принимает участие в регуляции образования мРНК, ответственной за противовирусную активность клеток. Интерферон-β, но не интерферон-α, ингибирует рост клеток гладких мышц сосудов. В результате реализации рецепторопосредуемой активности интерферона-β имеет место индукция олигоаденилатсинтетазы, гликозилтрансферазы, рибонуклеазы L, протеинкиназы p1, опухольспецифических антигенов, подавление онкогенов и рецепторов факторов роста [5].

Терапевтическое действие интерферона-β при РС заключается в ингибировании или модуляции активностей таких цитокинов, как интерферон-γ и фактор некроза опухолей (ФНО)-α, а также в усилении супрессорной функции Т-лимфоцитов. Доказано, что интерферон-β ингибирует синтез интерферона-γ, который играет важную роль в патогенезе РС, индуцируя синтез ФНО-α — цитотоксина олигодендроцитов. Кроме того, интерферон-β увеличивает уровень интерлейкина 10, стимулирует образование антагониста рецептора интерлейкина 1 и ингибирует пролиферацию лейкоцитов, уменьшает презентацию антигенов микроглии, снижает миграции Т-лимфоцитов в головной мозг, ингибируя активность матриксной металлопротеиназы, вызывает даун-регуляцию молекул адгезии [8].

Интерферон-β уменьшает экспрессию молекул HLA антигенпредставляющими клетками, соответственно снижая представительство этих детерминант Т-лимфо-

цитами и макрофагами, что ограничивает не только пролиферацию последних, но и проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Вследствие специфического взаимодействия с рецепторами Т-лимфоцитов и макрофагов интерферон-β тормозит продукцию ими провоспалительных цитокинов: интерферона-γ, лимфотоксина, факторов некроза опухолей α и β. В то же время интерферон-β стимулирует синтез и реализацию функции противовоспалительного цитокина — трансформирующего фактора роста β, который подавляет экспериментальный аллергический энцефаломиелит и снижает частоту экзацербаций при РС. Интерферон-β стимулирует супрессирующую функцию CD8-лимфоцитов.

При изучении иммунных механизмов эффектов интерферона-β выявлено, что он ингибирует активацию Т-клеток, вызываемую интерфероном-γ [5]. Кроме того, описана способность интерферона-β увеличивать апоптоз Т-клеток. Было обнаружено, что интерферон-β увеличивает содержание молекул B7–H1 в моноцитах и дендритных клетках, что может приводить к ингибированию активации аутологичных Т-клеток [5]. Интерферон-β также снижает экспрессию молекул, необходимых для презентации антигенов. Имеются экспериментальные доказательства того, что интерферон-β может переключить иммунный ответ от Т-хелперов Th1 на противовоспалительный Th2-ответ [5].

Описана способность интерферона-β увеличивать трансэндотелиальное электрическое сопротивление и снижать межклеточную проницаемость для различных молекул, в том числе и для иммунных клеток, а также уменьшать экспрессию адгезивных молекул и экспрессию хемокинов и матриксной металлопротеиназы [5]. После начала терапии интерфероном-β происходит быстрая нормализация проницаемости ГЭБ, о чём указывают данные магнитно-резонансной визуализации с контрастированием гадолинийсодержащими контрастными препаратами.

Помимо иммунологических механизмов действия интерферона-β при РС, имеют место и другие его эффекты, которые также могут влиять на пути формирования демиелинизирующего процесса. К ним относятся противовирусные и повышающие уровень кортикостероидов.

Установлено, что результатом лечения интерфероном-β может быть повышение кортикостероидной активности, которое также может играть роль в снижении частоты обострений РС.

Таким образом, положительное действие интерферона-β как иммунотерапевтического средства на течение ремитирующей формы и прогрессирование РС реализуется путём влияния на ряд ключевых механизмов иммунопатологического процесса при этом заболевании; определённое значение имеют также его эффекты неиммунологического характера.

Первым интерфероном-β, который прошёл все необходимые доклинические и клинические испытания, стал его подтип β-1б. У больных РС установлена выраженная дозовая зависимость силы фармакологического действия интерферона-β-1б, что доказывает наличие у него специфической фармакотерапевтической активности в отношении РС.

В виде готовой к применению лекарственной формы интерферон-β-1б (Бетаферон) появился в 1993 г. как препарат для лечения РС, что стало главным достижением в борьбе с данной болезнью. Его клиническая эффективность доказана с помощью объективных современных методик, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением [14].

Бетаферон — генноинженерная форма интерферона-β-1б. Он состоит из 165 аминокислот, его молекулярная масса составляет 18500 Да. Бетаферон отличается от природного интерферона-β по следующим позициям:

— в позиции 17 имеет сериновый аминокислотный остаток вместо цистеинового;

— не гликозилирован;
— характеризуется отсутствием N-концевого метионинового остатка.

Бетаферон представляет собой очищенный, стерильный, лиофилизированный белковый продукт, получаемый методом рекомбинации ДНК из штамма *E. coli*.

При проведении плацебо-контролируемого исследования, в котором приняли участие 372 пациента с ремитирующим РС, получавших интерферон-β-1б в дозе 8 млн ЕД подкожно через день в течение 2 лет, выявлено достоверное снижение частоты обострений на 34% ($p < 0{,}009$) [9]. Бетаферон увеличивал время до наступления первого обострения от начала исследования на 86% по сравнению с группой плацебо, а также количество пациентов, у которых не наблюдалось ни одного обострения в течение 2 лет наблюдения, — на 95%. Данные магнитно-резонансной томографии подтвердили клиническую эффективность Бетаферона: образования новых очагов после 2 лет терапии уменьшилось на 83% ($p < 0{,}009$) [2]. При этом доказано наличие дозовой зависимости [3]. Оказалось, что Бетаферон наиболее эффективен при раннем начале лечения, у пациентов с активным течением заболевания и небольшой степенью инвалидизации [2, 10].

В 1994 г. было начато большое многоцентровое плацебо-контролируемое исследование с целью оценить эффективность препарата интерферона-β-1б при лечении пациентов с вторично-прогрессирующим РС на 718 пациентах с суммой баллов неврологического дефицита по шкале EDSS от 3,0 до 6,5 в 32 клиниках Европы. Через 3 года были получены результаты, убедительно доказавшие клиническую эффективность интерферона-β-1б [6]. Замедление процесса ухудшения неврологического статуса было статистически достоверным ($p = 0{,}0008$). Интерферон-β-1б задерживал дальнейшее развитие инвалидизации на 9–12 месяцев за период исследования, длившийся 2–3 года. Соотношение вероятности подтверждённой задержки инвалидизации составило 0,65 (95% CI 0,52–0,83). Положительный эффект был очевиден как для пациентов с явными рецидивами, так и для пациентов с постепенно ухудшающимся неврологическим статусом, без рецидивов. Обнадёживающие результаты также получены в отношении периода времени до наступления стадии болезни, когда больной вынужден пользоваться инвалидным креслом; снизились частота и степень тяжести обострений, необходимость в стероидной терапии, количество случаев госпитализации. У больных улучшились показатели магнитно-резонансной томографии (МРТ). Препарат хорошо показал себя с точки зрения безопасности; его побочные эффекты не отличались от отмечавшихся ранее при использовании интерферона-β-1б. Исследование было прекращено после того, как промежуточные результаты со всей очевидностью доказали эффективность препарата, и, таким образом, интерферон-β-1б стал первым препаратом, для которого доказана терапевтическая эффективность при лечении больных ВПРС. У данных больных выявлен позитивный эффект Бетаферона в отношении выраженности локальной атрофии, т. е. количество и объём очагов гипоинтенсивности на T_1-взвешенных изображениях с контрастным усилением, так называемых чёрных дыр, которые лучше коррелируют со степенью инвалидизации по шкале EDSS, чем T_2-изображения: через 3 года в группе плацебо объём очагов увеличился на 41,8%, а при лечении Бетафероном на 23,2%. Таким образом, терапия Бетафероном позволила достоверно уменьшить образование «чёрных дыр», т. е. выраженность локальной атрофии на 45% по сравнению с группой плацебо [5]. На основании исследования эффективности применения Бетаферона при остро вновь возникшем РС (BENEFIT) интерферон-β-1б недавно разрешён для лечения клинически изолированных синдромов (первичные проявления демиелинизации, предположительно связанные с РС) [5].

В ряде стран для терапии РС разрешён глатимера ацетат (Копаксон), представляющий собой смесь синтетических полипептидов с молекулярной массой от 4700 до

11000 Да. Этот препарат подавляет активацию антигенами миелина Т-лимфоцитов, конкурируя с антигенами за связывание с участками основного компонента гистосовместимости класса II. При проведении клинических испытаний у 251 пациента с РС (опытная группа — 125 человек; контрольная группа — 126 человек) в течение 24 месяцев наблюдалось уменьшение частоты обострений на 29%. Однако копаксон не влиял на снижение когнитивных функций у больных РС, а уменьшение появления новых поражений головного мозга, выявляемых с помощью МРТ в случае копаксона, было выражено в меньшей степени (на 57%), чем при лечении Бетафероном (на 89%). Кроме того, копаксон необходимо вводить ежедневно, а Бетаферон вводят через день.

Наряду с Бетафероном, ставшим первым и наиболее изученным препаратом в ряду интерферонов-β, для лечения больных РС имеются и другие препараты этого ряда, а также иные иммуномодуляторы с показаниями для применения у больных РС. Сейчас существуют 2 препарата интерферона-β, которые разрешены FDA и Европейским агентством по оценке средств медицинского назначения (EMEA) для лечения клинически изолированного синдрома (КИЗ) — первых клинических проявлений демиелинизации, предположительно связанных с РС: интерферон-β-1б (Бетаферон, Bayer Schering Pharma AG) и интерферон-β-1а (Авонекс, Biogen Idec). Препарат интерферона-β-1а (Rebif, Serono, Inc.) разрешён EMEA для лечения РС при наличии подтверждённых критериев McDonald (КИЗ + доказательства наличия дессиминирования в пространстве и времени). Все названные препараты, а также глатимера ацетат (Копаксон) и митоксантрон (Новантрон) разрешены для лечения РС ремитирующего типа. С 2002 г. к этим препаратам по данному показанию добавлены натализумаб (Тизабри, Biogen Idec/ELAN) и только в Европе — азатиоприн (Имуран) (табл. 12.1).

Таблица 12.1

Современные лекарственные средства, разрешённые для лечения рассеянного склероза в Европе и США [5]

Международные непатентованные названия (торговые названия)	Клинический изолированный синдром	РС ремитирующего типа	Вторичнопрогрессирующий РС
Интерферон-β-1а (Авонекс)	Да	Да	Нет
Интерферон-β-1б (Бетаферон)	Да	Да	Да
Интерферон-β-1а (Ребиф 22 и 44 мкг)	Нет	Да	Да
Глатимера ацетат (Копаксон)	Нет	Да	Нет
Азатиоприн (Имуран)	Нет	Да (но не в США)	Нет
Натализумаб (Тизабри)*	Нет	Да	Нет
Митоксантрон (Новантрон)	Нет	Да	Да

* В России не зарегистрирован.

Величину биологической активности интерферона-β-1б определяют по его способности оказывать противовирусный эффект в клеточной культуре в сравнении со стандартным интерфероном-β-1б (код: Gxb02-901-535). Одна единица действия (ЕД) соответствует количеству интерферона-β, которое необходимо для предотвращения вызываемого вирусом клеточного лизиса в половине клеток тестируемой культуры. При использовании в качестве тест-систем ферментативной иммунносорбции или радиоиммунологического анализа определяются не только биологически активные мономеры интерферона-β-1б, но и биологически неактивные димеры инетерферона-β-1б, в то время как на активность интерферонов, определяемую с помощью клеточной культуры, влияет растворимость молекул в воде. Поэтому с помощью данных тест-систем трудно сравнить интерферон-β-1б и интерферон-β-1а, так как они обладают различными физико-химическими свойствами. Единственный имеющийся фармацевтический препарат интерферона-β-1б (Бетаферон/Бетазерон) в сравнении со стандартным интерфероном-β-1б (ВОЗ) имеет специфическую активность 32 млн ЕД/мг. Вследствие отличий физико-химических свойств между интерфероном-β-1б и интерфероном-β-1а для определения активности двух указанных препаратов используются разные стандарты ВОЗ: коды 00/572 и Gxb02-901-535 соответственно [5].

В используемых препаратах Бетаферона содержится 250 мкг интерферона-β-1б, Ребифа — 22 или 44 мкг интерферона-β-1а и Авонекса — 30 мкг интерферона-β-1а. При сравнении способности этих препаратов индуцировать в сыворотке больных РС белок устойчивости к миксовирусам (MxA) наибольшей активностью обладал Бетаферон (2,29 нг/10^5 лимфоцитов периферической крови), затем Ребиф 22 (1,00 нг/10^5 лимфоцитов) и Авонекс (0,57 нг/10^5 лимфоцитов) [5]. Важно отметить, что данные сравнительные исследования по определению биомаркёра фармакологической активности интерферонов-β соответствуют данным ряда сравнительных исследований их клинической эффективности у больных РС [2, 3, 7, 15, 17].

Два препарата интерферона-β (Бетаферон и Ребиф), а также митоксантрон имеют показание для лечения вторично-прогрессирующего РС с рецидивами. Интерферон-β-1а является также биотехнологическим продуктом. Испытания клинической эффективности интерферона-β-1а, который по структуре аналогичен естественному белку, при ремитирующем течении РС проводились в 22 клиниках мира (PRISMS) [12]. В этом исследовании участие приняли 560 пациентов с суммой баллов неврологического дефицита по шкале EDSS от 0 до 5,0. Согласно полученным результатам, после 2 лет лечение в дозе 22 мкг снизило частоту обострений в год на 29 %, а в дозе 44 мкг — на 32 % ($p < 0{,}005$). Время до наступления первого обострения от начала исследования на фоне лечения высокой дозой интерферона-β-1а увеличилось на 113 %, а в дозе 22 мкг — на 70 % по сравнению с группой плацебо. Количество пациентов, у которых не отмечалось ни одного обострения в течение 2 лет наблюдения, увеличилось на 100 % в группе больных, получавших лечение интерфероном-β-1а в высокой дозе, и на 69 % — в группе больных, получавших его в дозе 22 мкг [7]. По данным МРТ, количество активных очагов на фоне лечения Ребифом в высокой дозе уменьшилось на 78 %, а в дозе 22 мкг — на 67 % ($p < 0{,}0001$) [2].

Терапия интерферонами-β, помимо влияния на среднегодовую частоту обострений, позволяет достоверно снизить частоту средних и тяжёлых обострений, частоту госпитализаций, необходимость проведения кортикостероидной терапии [1, 6]. В 2001 г. опубликованы результаты испытаний интерферона-β-1а при вторично-прогрессирующем РС (SPECTRIMS) [13]. Статистически значимого положительного влияния препарата на время наступления подтверждённого прогрессирования РС достигнуто не было [11], и эффективность препарата в дозе 44 мкг зарегистрирована

только у пациентов с активным течением болезни, т. е. с сохраняющимися обострениями заболевания.

Многоцентровые рандомизированные испытания эффективности интерферона-β-1а, вводимого внутримышечно в дозе 6 млн ЕД 1 раз в неделю, с участием 301 пациента с ремитирующим РС показали, что после 2 лет терапии наблюдаются снижение частоты обострений в год на 18% ($p = 0{,}04$), увеличение количества пациентов без обострений на 42%, увеличение времени до наступления первого обострения на 31% [4]. В группе больных, получавших лечение интерфероном-β-1а, количество МРТ-определяемых очагов уменьшилось на 33% ($p = 0{,}05$) и объём очагового поражения мозга на 6,7% ($p = 0{,}36$), но это различие не достигло статистической значимости.

В результате проведения прямых рандомизированных сравнительных исследований оценки эффективности Бетаферона и Авонекса (INCOMIN) с участием 188 пациентов и Ребифа и Авонекса (EVIDENCE) с участием 677 больных было показано, что клинический эффект препарата зависит от дозы и кратности введения лекарственного средства [2, 17]. Высокие дозы интерферона-β, вводимые 3 раза в неделю, более эффективны, чем низкие, вводимые 1 раз в неделю. Метод введения — внутримышечный или подкожный — не влияет на эффективность препаратов. Бетаферон и Ребиф обладают большей эффективностью для лечения пациентов с РС по сравнению с Авонексом [12, 13], а раннее начало лечения препаратами интерферона-β уменьшает накопление неврологического дефицита и отодвигает наступление инвалидизации.

Таким образом, в неврологии в основном благодаря созданию препаратов интерферонов-β, начиная с 1993 г. началась новая эра в лечении РС. За это время уже имеются наблюдения за пациентами, которые в течение 16 лет лечатся Бетафероном. Эти наблюдения свидетельствуют о хорошей длительной переносимости этого препарата, его способности замедлять процесс демиелинизации и уменьшать смертность от этого заболевания. Вместе с тем продолжаются поиски более оптимальных режимов применения препаратов интерферона-β (например, исследования, обосновывающие необходимость повышения дозы интерферона-β-1б в 2 раза), а также расширение показаний для его применения.

Можно констатировать наличие следующих положений в области фармакотерапии РС, которые характеризуют достигнутый прогресс в этой области благодаря рекомбинантным препаратам интерферона-β.

Согласно последним материалам группы по консенсусу лечения РС препараты интерферона-β или глатимера ацетата предпочтительны в качестве стандартной базисной терапии этого заболевания. Как альтернатива можно использовать азатиоприн при РС ремитирующего типа. При прогрессировании заболевания или очень активной начальной фазе заболевания можно применять натализумаб или митоксантрон.

Лечение двойной стандартной дозой интерферона-β-1б (500 мкг через день) хорошо переносится. С помощью слепого контроля установлено, что интерферон-β-1б (введение через день) по сравнению с интерфероном-β-1а (раз в неделю) имеет преимущество в отношении снижения повреждений в ЦНС, выявляемых методом магнитно-резонансной визуализации. Однако результатов двойного слепого клинического исследования сравнения интерферона-β-1б и интерферона-β-1а всё ещё нет.

Результаты лечения больных РС интерфероном-β-1б в течение 16 лет подтвердили его безопасность и способность снижать смертность от этого заболевания.

Продолжает обсуждаться роль возникновения у ряда больных при длительном лечении антител против интерферона-β в реализации его клинической эффективности.

Продолжаются исследования, которые должны дать возможность предсказать индивидуальный ответ на лечение препаратами интерферона-β.

При лечении интерфероном-β-1б следует избегать беременности, так как при этом увеличена частота спонтанного аборта, хотя тератогенного эффекта интерферона-β-1б не выявлено. При возникновении беременности следует прервать лечение интерфероном-β-1б.

Лечение детей интерфероном-β-1б характеризуется безопасностью и обычно хорошо переносится. Рекомендуется регулярно следить за функцией печени, особенно у детей в возрасте меньше 11 лет.

Продолжаются исследования возможности лечения РС с помощью новых иммуномодулирующих средств, в частности моноклональных антител (например, алемтузумаба), которые необходимо вводить лишь один раз в месяц.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 12

1. *Бойко А.Н., Гусев Е.И.* Бета-интерфероны при РС // Неврологии и Психиатрии. Спец. выпуск. 2002. С. 65–71.
2. *Гусев Е.И., Дёмина Т.Л., Хачанова Н.В.* Сравнительный анализ β-интерферонов, используемых для лечения рассеянного склероза // 2003. № 1. С. 45–50.
3. *Allian H., Schuck S.* Observations on differences between interferons used to treat multiple sclerosis // J. Clin Res. 1998. № 1. P. 381–392.
4. *Barkhof F., Waesberghe J.H., Filippi M. et al.* T. 1. hypointense lesions in secondary progressive multiple sclerosis: effect of interferon beta-1b treatment // Brain. 2001. V. 124. P. 1396–1402.
5. *Buttmann M., Rieckmann P.* Interferon-β_{1b} in multiple sclerosis // Expert Review of Neurotherapeutics. 2007. V. 7, № 3. P. 227–239.
6. European Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS. Placebo-controlled multicenter randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis // Lancet. 1998. V. 352. P. 1491–1497.
7. *Durelli L. et al.* The INCOMIN Study // Lancet. 2002. 359. P. 1453–1460.
8. *Feng X., Yau D., Holbrook C., Reder A.T.* Type I interferons inhibit Interleukin-10 production in activated human monocytes and stimulate IL-10 in T cells: implications for Th1-mediated diseases // J. Interferon. Cytokine Res. 2002. V. 22. P. 311–319.
9. IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // Neurology. 1993. V. 43. P. 655–661.
10. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS / MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomised controlled trial // Neurology. 1995. V. 45. P. 1277–1285.
11. *Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A. et al.* Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis // Ann. Neurol. 1996. V. 39. P. 285–294.
12. *Li D.H., Paty D.W.* UBC MS / MRI Analysis Research Group et al. Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: randomised, double-blind, placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis // Ann. Neurol. 1999. № 4. P. 197–206.
13. *Li D.H., Zhao G.J., Paty D.W.* UBC MS/MRI Analysis Research Group and the SPECRTIMS Study Group. Randomised controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS. MRI results // Neurology. 2001. V. 56. P. 1505–1513.
14. *Simon J.H., Lull J., Jacobs L.D. et al.* A longitudinal study of T. 1. hypointense lesions in relapsing MS // Neurology. 2000. V. 53. P. 185–192.
15. *Sturzebecher S., Mailbauer R., Heuner A. et al.* Pharmacodynamic comparison of single doses of IFNβ-1a and IFNβ-1b in healthy volunteers // J. Int. Cyt. Res. 1999. V. 19. P. 1257–1264.
16. *Vartanian T.K., Zamvil S.S., Fox E., Sorensen P.S.* Neutralizing antibodies to disease-modifying agents in the treatment of multiple sclerosis // Neurology. 2004. V. 63. P. 42–49.
17. *Williams G.J., Witt P.L.* Comparative study of the pharmacodynamic and pharmacologic effects of Betaferon and Avonex // J. Int. Cyt. Res. 1998. V. 18. P. 967–975.

Глава 13

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА

В систему гемостаза входят 4 основных компонента.

1. Свёртывающая система крови, представленная 13 факторами (коагуляционное звено):

I — фибриноген, гликопротеид, один из самых крупных белков плазмы, молекулярная масса 340 000 Да, длина молекулы 46 нм (для сравнения молекула IgG имеет длину 20 нм);

II — протромбин;

III — тканевой тромбопластин, белково-липидный комплекс, содержится в мембранах эндотелия, гладкомышечных клетках сосудов, в моноцитах;

IV — ионы кальция;

V, VII, VIII, IX, X, XI, XII — сериновые протеазы (гидролазы, содержащие в активном центре остаток аминокислоты серина), циркулируют в крови в неактивной форме — в виде зимогенов;

XIII — фибринстабилизирующий фактор.

2. Тромбоцитарное звено (тромбоциты или кровяные пластинки).

3. Антикоагулянтная система:

— вещества, продуцируемые эндотелием, — простациклин (ингибитор тромбоцитов и вазорелаксант), гепарин;

— три белка, синтезирующиеся в печени, — ингибитор протеиназ антитромбин III, протеин С (С-реактивный белок, С-пептид), протеин S. (Протеин С — фермент, расщепляющий активированные V, VIII и IX свёртывающие факторы; циркулирует в неактивном виде. Протеин S служит кофактором реакций, катализируемых протеином С.)

4. Система фибринолиза — плазминоген и его эндогенные активаторы:

— тканевой активатор плазминогена (t-PA);

— урокиназа (u-PA).

Процесс гемостаза — это 5 последовательных этапов реакций:

1) самая быстрая во времени реакция — локальная рефлекторная вазоконстрикция;

2) адгезия тромбоцитов к повреждённому участку стенки сосудов, экспрессия на их поверхности отрицательно заряженных фосфолипидов (фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, фосфатидилтидной кислоты);

3) агрегация тромбоцитов и образование тромбоцитарной пробки, которая плотно закрывает место повреждения;

4) образование тромбина на мембранах тромбоцитов — конечный этап внешнего и внутреннего путей коагуляции. Тромбин — ключевой фермент гемостаза — вызывает 4 эффекта: а) преобразует растворимый фибриноген в мономеры фибрина; б) активирует фактор XIII — наступает ретракция фибринового сгустка; в) стимулирует

тромбоциты; г) активирует протеин С; свёртывание крови, образование фибринового сгустка;

5) фибринолизис и восстановление кровотока в затромбированном сосуде.

Первичная локальная вазоконстрикция — результат стимуляции симпатических нервных окончаний в гладких мышцах сосудистой стенки. Последующая вазоконстрикция возникает при активации у места повреждения стенки сосудов тромбоцитов и реакции высвобождения из них серотонина, тромбоксана A_2 — наиболее мощного из известных эндогенных вазоконстрикторов и β-тромбоглобулина, который вызывает локальное ингибирование синтеза простациклина — сильного вазодилататора, что создаёт благоприятные условия для агрегации тромбоцитов и роста тромба.

Адгезия (от лат. *adhaesio* — прилипание, сращение) тромбоцитов — происходит при взаимодействии их с коллагеном, базальной мембраной и микрофибриллами. Связующим звеном между тромбоцитами и обнажёным субэндотелием является фактор Виллебранда. В процессе адгезии тромбоциты из дисковидных превращаются в сферические, что способствует их контакту друг с другом.

Агрегация (от лат. *aggregatio* — скопление, соединение) тромбоцитов — следующий этап активации кровяных пластинок. Он протекает по схеме:

агонист → взаимодействие с рецептором → поступление в тромбоцит сигнала, мобилизующего кальций из плотной тубулярной системы в цитоплазму и активирующего фосфолипазы A_2 и С → освобождение арахидоновой кислоты → образование эндоперекисей простагландинов ПГG2 и ПГН2 под влиянием фермента циклооксигеназы → образование тромбоксана A_2 под действием тромбоксансинтетазы → мобилизация кальция, повышение его концентрации в цитоплазме и снижение уровня цАМФ в тромбоцитах → индукция их реакции сокращения, обусловленная активацией Са-зависимой АТФазы, тромбоцитарного актомиозина и тромбостенина → изменение свойств мембраны и формы тромбоцитов с образованием псевдоподий → прилипание тромбоцитов друг к другу → реакция высвобождения из них биологически активных соединений (АДФ, тромбоксана A_2, серотонина, β-тромбоглобулина, фибронектина, тромбоспондина) → образование тромба.

Свёртывание крови, образование окончательного гемостатического тромба происходит при каскадной ферментативной активации плазменных факторов и включает 4 последовательные фазы: образование протромбиназы, образование тромбина, фибрина, в нитях которого задерживаются форменные элементы крови, и ретракция кровяного сгустка. Образуется гемостатический тромб.

Завершает механизм гемостаза фибринолиз — процесс, который удаляет отложение фибрина в пределах кровотока и тем самым предупреждает блокаду кровеносных сосудов тромбами. Под фибринолизом понимают ферментативное расщепление фибриновых волокон на растворимые фрагменты, которые удаляются из сосудистого русла. Фибринолизис определяется сложным взаимодействием между фибрином, плазминогеном, его активаторами, плазмином и ингибиторами фибринолитической системы. Превращение плазминогена в сериновую протеазу плазмин является основной ступенью фибринолиза.

Лекарственные средства, влияющие на систему гемостаза, могут предотвращать образование тромбов, угнетая свёртывающую систему крови и тромбоцитарное звено. Они могут способствовать растворению (лизису) уже образовавшегося тромба, активируя фибринолитическую систему. И, наконец, могут применяться при состояниях повышенной кровоточивости, когда их действие направлено на активацию свёртывающей системы крови [1–15].

Фармакологические вещества, влияющие на систему гемостаза, разделены на 5 групп.

I группа. Вещества, активирующие процессы свёртывания крови (прокоагулянты):
а) препараты витамина К (викасол, фитоменадион);
б) препараты, применяемые при тромбоцитопенических состояниях.

II группа. Лекарственные препараты, ингибирующие систему свёртывания крови (антикоагулянты). По механизму действия выделяют антикоагулянты прямого и непрямого типа действия. К антикоагулянтам прямого действия относятся: гепарин (нефракционированный гепарин, НФГ); низкомолекулярные гепарины (НМГ) — эноксапарин, надропарин, дальтепарин; гирудин, цитрат натрия и ЭДТА (этилендиамин тетрауксусная кислота). Антикоагулянты непрямого типа действия включают производные кумарина: варфарин, дикумарин, неодикумарин.

III группа. Лекарственные вещества, активирующие фибринолиз (фибринолитические средства): препараты стрептокиназа и урокиназа, тканевой активатор плазминогена.

IV группа. Антифибринолитические препараты: аминокапроновая кислота, парааминометилбензойная кислота (ПАМБК), трансекзамовая кислота, амбен — по механизму действия конкурентные ингибиторы активаторов плазминогена.

V группа. Антитромбоцитарные вещества, угнетающие активность тромбоцитов.

13.1. Лекарственные препараты, ингибирующие систему свертывания крови (антикоагулянты)

По механизму действия непрямые антикоагулянты — антагонисты витамина К, они ингибируют работу фермента редуктазы витамина К, в результате образующаяся окисленная форма витамина К не превращается в активную восстановленную форму.

К прямым антикоагулянтам относится гепарин — природный антикоагулянт, синтезируется в эндотелиальных клетках, депонируется в тучных. Самая сильная органическая кислота в организме. По химической природе — мукополисахарид. Молекулярная масса от 3000 до 40000 Да, концентрация в плазме крови около 1,5 мг/л.

Активность гепарина зависит от находящегося в плазме белка — природного ингибитора сериновых протеиназ — антитромбина III. Антитромбин III, связываясь с активированными свёртывающими факторами (в частности, с тромбином, IX, XI, XII), образует комплексы, лишённые протеолитической активности. В отсутствии гепарина такие комплексы формируются медленно (в течение 10–30 мин), а в присутствии гепарина для их образования требуется несколько секунд.

Гепарин обладает широким спектром биологического действия. При его применении нередко наблюдаются побочные эффекты. Помимо влияния на свёртываемость крови, он обладает гиполипидемическим, иммунодепрессивным действием, вызывает гипогликемию, снижение АД, повышает проницаемость капилляров, приводит к тромбоцитопении. Длительное лечение гепарином (больше 6 месяцев при ежедневном приёме 15000 ЕД) иногда приводит к остеопорозу с возможными спонтанными переломами рёбер и позвонков. После окончания лечения остеопороз медленно регрессирует.

В настоящее время на фармакологическом рынке гепарин потеснил ещё один природный антикоагулянт — гирудин. Он выделен из слюнных желёз медицинской пиявки и впервые изучен в 1950-х гг.

Гирудин представляет собой небольшой пептид, сходный по структуре с гормоном роста, состоит из 66 аминокислотных остатков. К особенностям химического строения гирудина относятся: 1) существование в молекуле нерасщепляемой протеазами пептидной связи лизин–пролин, которая придаёт ему устойчивость к гидролизу;

2) наличие сильного отрицательного заряда, обусловленного С-концевым фрагментом (последними 16 аминокислотными остатками).

По механизму действия гирудин — прямой ингибитор тромбина. При взаимодействии гирудина с тромбином образуется высокоспецифический нековалентный комплекс, при этом тромбин инактивируется.

Сравнение антикоагулянтных свойств гирудина и гепарина свидетельствует о важных преимуществах гирудина. Во-первых, действие гирудина не опосредовано каким-либо эндогенным кофактором. Во-вторых, в отличие от гепарина, он является слабым иммуногеном. Фармакологически инертен: не влияет на клетки крови, плазменные белки и ферменты. Эффективен при недостаточности антитромбина III, может быть также использован при тромбоцитопатиях.

К антикоагулянтам прямого действия относят натрия гидроцитрат. Механизм его противосвёртывающего эффекта заключается в связывании ионов кальция (образуется кальция цитрат), необходимых для превращения протромбина в тромбин. Используется натрия гидроцитрат (4–5 %) для стабилизации крови при её консервировании.

С химической точки зрения гепарин представляет собой смесь полимеров, состоящих из остатков сахаридов, молекулярная масса которых колеблется в пределах 5000–30000 Да. Молекулы такого полимера имеют места связывания с антитромбином плазмы крови — определённую пентасахаридную последовательность (рис. 13.1).

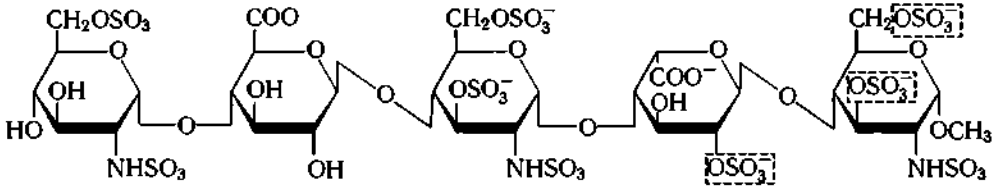


Рис. 13.1. Структурно-функциональная пентасахаридная последовательность гепаринов

При взаимодействии гепарина с антитромбином активность последнего резко возрастает. Это создаёт предпосылки для подавления каскада реакций свёртывания крови, благодаря чему и реализуется антикоагулянтное действие гепарина. Необходимо отметить, что «нефракционированный» гепарин содержит полимеры с различной длиной цепи. Небольшие по размеру молекулы гепаринов усиливают антикоагулянтное действие за счёт подавления активности фактора Ха, однако они не способны усиливать эффект антитромбина, направленный на угнетение фактора свёртывания крови IIa. В то же время гепарины с большей длиной цепи повышают активность антитромбина в отношении фактора IIa (рис. 13.2). Гепарины, которые активируют антитромбин, составляют третью часть «нефракционированного» гепарина.

Таким образом, с химической точки зрения НМГ являются гетерогенной смесью сульфатированных гликозаминогликанов. Лекарственные средства на основе НМГ имеют ряд преимуществ по сравнению с «нефракционированным» гепарином. Так, при их использовании можно с большей точностью предсказать дозозависимый антикоагулянтный эффект, они характеризуются повышенной биодоступностью при подкожном введении, более продолжительным периодом полураспада, низкой частотой развития тромбоцитопении. Кроме того, нет необходимости регулярно проводить определение времени свёртывания крови или активированного частичного тромбопластинового времени. Все НМГ имеют сходный механизм действия, но различная молекулярная масса обусловливает разную их активность в отношении фактора свёртывания Ха и тромбина, а также различное сродство к белкам плазмы крови (рис. 13.3).

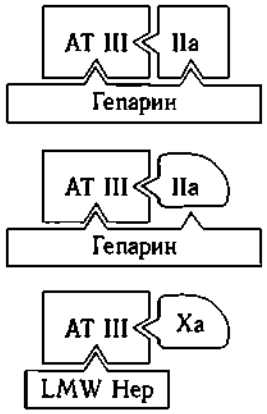


Рис. 13.2. Молекулярный механизм ATIII (антитромбин III)-зависимого действия гепарина и низкомолекулярного гепарина (LMW Hep)

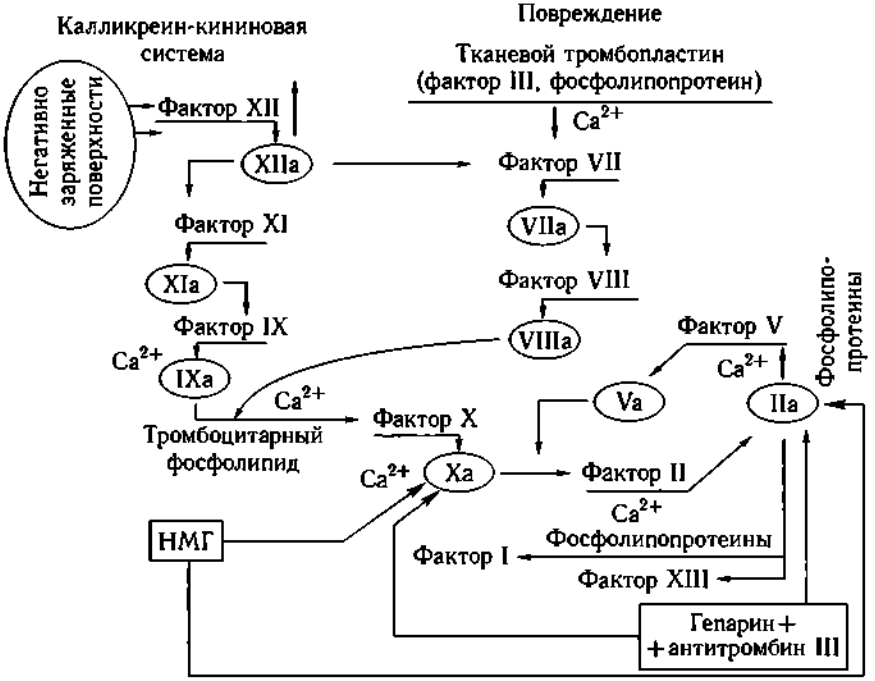
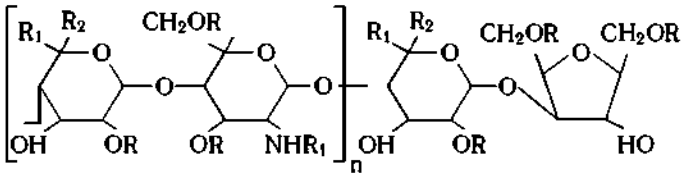


Рис. 13.3. Особенности антикоагуляционного действия «нефракционированного» гепарина (НФГ) и его низкомолекулярных производных (НМГ)

Препараты НМГ различаются по химической структуре, методам получения, периоду полураспада, специфическому действию, и поэтому они не могут быть взаимозаменяемыми. НМГ получают путём деполимеризации гепарина, выделенного из слизистых оболочек свиньи различными методами. Например, далтепарин получают методом деполимеризации с использованием азотистой кислоты, эноксапарин — методом бензилирования с последующей щелочной деполимеризацией, для получения тинзапарина используют метод ферментативного расщепления «нефракционирован-

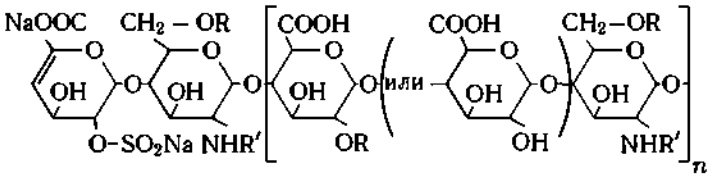
ного» гепарина с помощью гепариназы. Применяя различные способы деполимеризации, получают НМГ различной химической структуры с различным количеством мест связывания с антитромбином, а также других функциональных химических групп, которые принимают участие в реакциях противосвёртывающей системы крови (рис. 13.4). В связи с тем что НМГ отличаются по своей химической структуре, соответствующие препараты данного ряда проявляют специфическую активность в отношении фактора свёртывания Xa (рис. 13.5, 13.6).

Далтепарин



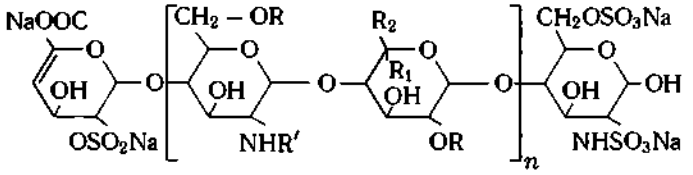
$R = H$ или SO_3Na
$R_1 = COCH_3$ или SO_3Na
$R_2 = H$
$R_3 = COONa$
$n = 3–20$

Эноксапарин



$R = -H$ или SO_3Na
$R' = -SO_3Na$ или $-C(=O)-CH_3$
$n = 3–20$

Тинзапарин



$R = H$ или SO_3Na
$R_2 = H$
$R_3 = COONa$
$R' = H$ или SO_3Na или $COCH_3$
$n = 1–25$

Рис. 13.4. Химическая структура некоторых низкомолекулярных гепаринов

Необходимо также отметить, что препараты НМГ обладают различной биодоступностью, поэтому режим дозирования, способ введения и показания к применению каждого из них несколько отличаются. Иными словами, препараты НМГ не являются взаимозаменяемыми, их необходимо применять в соответствии с утверждёнными показаниями.

Фармакологические и клинические эффекты НМГ суммированы в табл. 13.1.

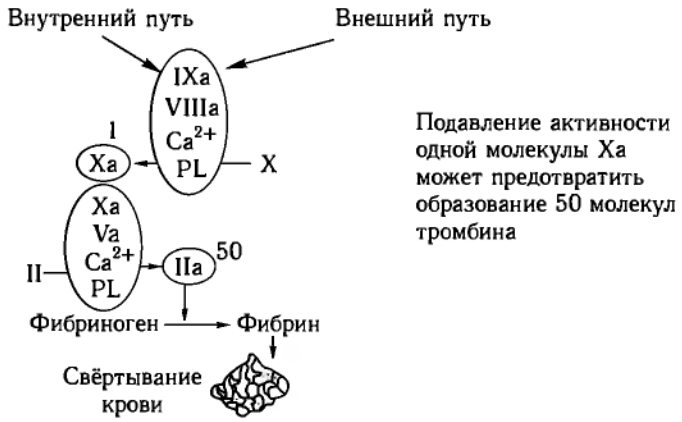


Рис. 13.5. Ключевая роль фактора Xa в коагуляционном звене гемостаза

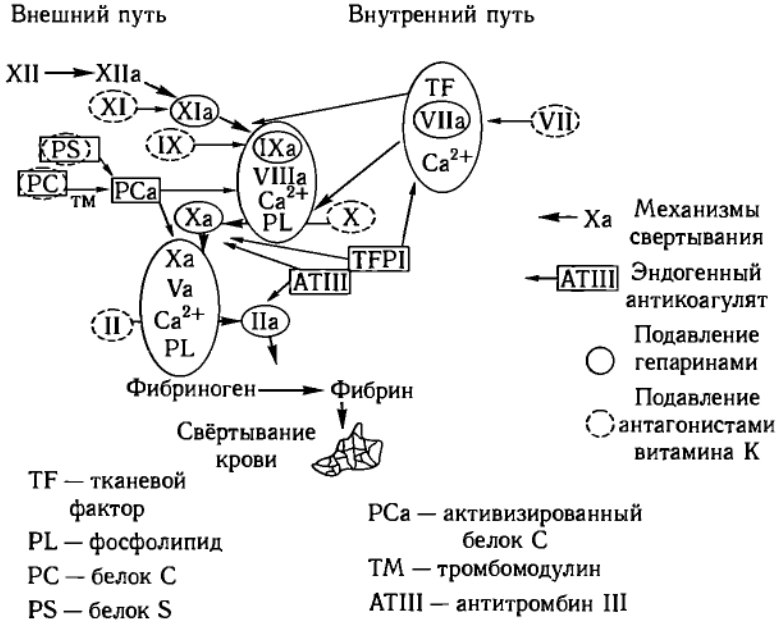


Рис. 13.6. Мишени действия лекарственных веществ на каскаде свёртывания крови

НМГ широко используют при лечении острого коронарного синдрома, тромбоза глубоких вен нижних конечностей, эмболии лёгочной артерии.

Наряду с опосредованными антитромбином эффектами, НМГ оказывают несвязанное с антитромбином действие, в частности вызывают выделение тканевого ингибитора тромбопластина, подавляют освобождение фактора фон Виллебрандта (секретируется тромбоцитами и эндотелиальными клетками и вызывает агрегацию тромбоцитов), устраняют прокоагулянтную активность лейкоцитов, улучшают эндотелиальную функцию и др.

НМГ — современные эффективные лекарственные средства для лечения и профилактики различных тромбоэмболических состояний. НМГ действуют на различные механизмы системы свёртывания крови, а также оказывают положительное влияние

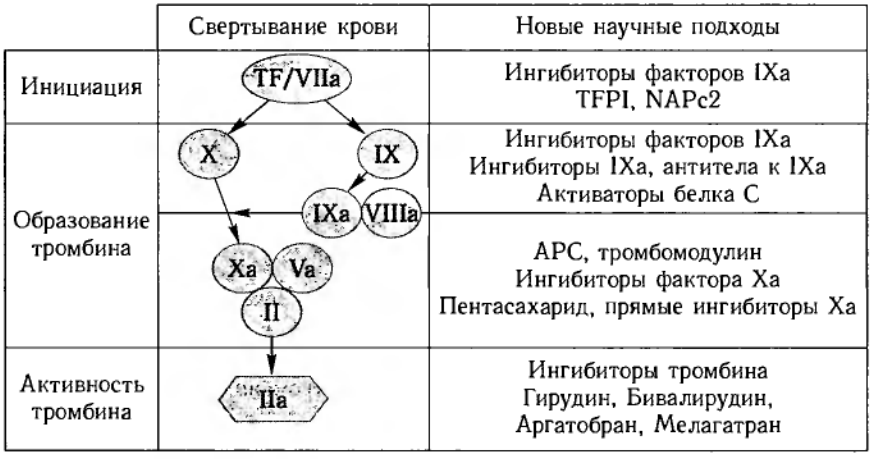
Таблица 13.1

Фармакологические и клинические эффекты низкомолекулярных гепаринов (НМГ)

Мишень действия НМГ	Тромбин, белки, макрофаги, тромбоциты, остеобласты
Фармакологические свойства	Снижение активности фактора свёртывания IIa; повышенная биодоступность; предсказуемый антикоагулянтный эффект; быстрая клубочковая фильтрация; низкая частота выработки антител к НМГ; незначительная активация остеобластов
Особенности применения	НМГ эффективны при подкожном способе введения; не требуют регулярного определения времени свёртывания крови или активированного частичного тромбопластинового времени; продолжительный период полураспада; терапевтический эффект проявляется при приёме 1 раз в сутки; низкая частота развития тромбоцитопении, вызванной гепарином; низкая частота развития остеопороза

на клетки крови и эндотелия, ослабляя их проагрегантные свойства. Несомненное преимуществом препаратов данного фармакологического ряда — отсутствие необходимости регулярного и частого взятия крови для определения времени свёртывания крови и активированного частичного тромбопластинового времени [16–39].

Перспективные направления поиска новых мишеней действия лекарственных средств, регулирующих свёртывание крови, представлены на рис. 13.7.



TFPI — ингибиторы пути тканевого фактора

APC — активированный белок С

NAPc2 — антикоагулянтный белок нематод С2

ATIII — антитромбин III

Рис. 13.7. Перспективные направления фармакологической регуляции гемостаза

Одним из инновационных препаратов, который может заменить препараты гепарина, является ривароксабан. Данные III фазы многоцентрового рандомизированного двойного слепого клинического исследования RECORD4 (Regulation of Coagulation in major Orthopedic surgery reducing the risk of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism), опубликованные в журнале «The Lancet», свидетельствуют о более высокой эффективности новейшего антикоагулянта Xarelto/Ксарелто (ривароксабан), если сопоставлять с эноксапарином. В исследование были вовлечены 3148 пациентов,

перенёсших операцию по полной замене коленного сустава. Участники одной группы для снижения риска тромбозов применяли ривароксабан по 1 таблетке (10 мг) один раз в сутки, второй — эноксапарин — 30 мг парентерально два раза в сутки [40].

Согласно результатам исследования ривароксабан является единственным таблетированным антикоагулянтом, продемонстрировавшим бóльшую эффективность, чем эноксапарин в указанной дозировке, для профилактики венозной тромбоэмболии среди пациентов, перенёсших операцию по полной замене коленного сустава. В это же время частота значительных кровотечений (основная конечная точка безопасности) была низкой в обеих группах.

Ривароксабан — высокоселективный прямой ингибитор фактора Ха, имеющий достаточную биодоступность при пероральном применении. Подавление фактора Ха играет центральную роль в коагуляционном каскаде.

Ривароксабан оказывает дозозависимое влияние на протромбиновое время и близко коррелирует с концентрациями в плазме крови ($r = 0{,}98$). Кроме того, ривароксабан дозозависимо увеличивает активированное частичное В период лечения ривароксабаном в проведении мониторинга параметров свёртывания крови нет необходимости. Абсолютная биодоступность ривароксабана после приёма дозы 10 мг высокая и составляет 80–100 %.

Ривароксабан быстро всасывается; максимальная концентрация достигается через 2–4 ч после приёма таблетки. В организме человека большая часть ривароксабана (92–95 %) связана с белками плазмы крови, основным связывающим компонентом является сывороточный альбумин. Объём распределения средний, составляет приблизительно 50 л. Ривароксабан выводится преимущественно в форме метаболитов (приблизительно 2/3 применяемой дозы), причём половина из них выводится почками, а другая половина — с калом; 1/3 применяемой дозы подвергается прямой почечной экскреции с мочой в виде неизменённого активного вещества, ориентировочно в основном с помощью активной почечной секреции.

Метаболизм ривароксабана осуществляют изоферменты CYP 3A4, CYP 2J2, а также ферменты, независимые от системы цитохрома P-450. Основными участником биотрансформации является морфолиновая группа, подвергающаяся окислительному разложению, и амидные группы, подвергающиеся гидролизу. Согласно полученным *in vitro* данным, ривароксабан является субстратом для белков-переносчиков P-gp (P-гликопротеина) и BCR-P (белка резистентности к раку молочной железы).

Неизменённый ривароксабан является наиболее значимым соединением в плазме крови человека, активные циркулирующие метаболиты в плазме крови не выявлены. Ривароксабан, системный клиренс которого составляет приблизительно 10 л/ч, может быть отнесён к лекарственным веществам с низким уровнем клиренса. При выведении ривароксабана из плазмы крови конечный период полувыведения составляет 5–9 ч у молодых пациентов и 11–13 ч у пациентов пожилого возраста.

Ривароксабан был разработан компанией «Bayer» совместно с «Johnson&Johnson Pharmaceutical Research & Development, L. L. C.». Исследование RECORD4 является частью программы RECORD, которая включала более 12 500 пациентов, перенёсших операции по замене тазобедренного или коленного суставов. Результаты программы RECORD обеспечили одобрение препарата Xarelto Европейской комиссией в сентябре 2008 г. для применения с целью профилактики венозной тромбоэмболии среди взрослых пациентов, которым проводятся обширные ортопедические оперативные вмешательства на нижних конечностях.

Антикоагулянты используют для профилактики и терапии венозного тромбоза. Венозные тромбы образуются при варикозном расширении вен, флебитах — воспалении вен, могут образовываться в неизменённых сосудах на фоне венозного застоя, а также в камерах сердца, чаще всего при эндокардите (бактериальном, ревма-

тическом), стенозе митрального клапана, мерцании предсердий. Венозные тромбы состоят из «белой головки», содержащей тромбоциты, и красного «хвоста», нередко свободно перемещающегося в просвете сосуда. Хвост состоит из фибрина и клеток крови, в основном эритроцитов, придающих им характерную окраску. Опасность венозного тромбоза определяется возможностью эмболии сосудов лёгких, мозга, других жизненно важных органов.

13.2. Фибринолитики

В отличие от антикоагулянтов, которые применяются для предупреждения образования тромба, фибринолитики (тромболитики, тромболитические средства) способствуют растворению уже образовавшегося тромба или эмбола.

В норме циркулирующий в крови плазминоген (β-глобулин, молекулярная масса 143 000 Да) адсорбируется тромбом и подвергается активации, превращаясь в плазмин. Плазмин обладает трипсиноподобной активностью, расщепляет в фибрине пептидные связи, образованные аргинином и лизином. Эндогенные активаторы плазминогена — это группа сериновых протеаз. Они выделяются из эндотелия, макрофагов, часть из них образуется из неактивных предшественников зимогенов под действием активированного фактора Хагемана.

Современные тромболитические средства можно условно разделить на 3 основные группы:

1) препараты первого поколения, которые приблизительно в одинаковой мере активируют и связанный с фибрином, и циркулирующий в крови плазминоген и имеют короткие $t_{1/2}$ (стрепто- и урокиназа);

2) препараты второго поколения, обладающие относительной специфичностью к связанному с фибрином плазминогену и более продолжительными $t_{1/2}$ (рекомбинантная проурокиназа; АПСАК — анизоилированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс; рекомбинантный тканевый активатор плазминогена — ТАП; рекомбинантная стафилокиназа);

3) препараты третьего поколения, обладающие более высокой тромболитической активностью благодаря изменениям в их молекулах, которые были внесены с помощью метода генной инженерии (негликозилированный рекомбинантный ТАП; химерные молекулы, содержащие различные участки ТАП и урокиназы, и др.).

Сравнительная характеристика основных применяемых в настоящее время тромболитических препаратов представлена в табл. 13.2.

Стрептокиназа — прямой активатор плазминогена. Это одноцепочечный полипептид, не содержащий углеводов, с молекулярной массой 47000 Да, который вырабатывается из культуры β-гемолитического стрептококка группы С (по классификации Лансфильда). Стрептокиназа — неферментный белок, образующий стехеометрический комплекс 1 : 1 с плазмином, молекула которого при этом претерпевает конформационные изменения, приводящие к обнажению его активного центра. Комплекс стрептокиназа–плазминоген играет роль фермента в превращении эндогенного плазминогена в плазмин, причём он приблизительно в одинаковой степени активирует как связанные с фибриновым тромбом, так и свободные, циркулирующие в крови молекулы плазминогена; $t_{1/2}$ стрептокиназы 15–25 мин. Стрептокиназу получают из культуры бактерий, вследствие чего она обладает антигенными свойствами. В крови человека всегда обнаруживаются антитела против стрептокиназы, что связано с большой распространённостью стрептококковых инфекций в общей популяции. Титры антистрептокиназных антител быстро нарастают в течение нескольких дней после её введения и через несколько недель достигают пика. Этот пик может в 1000 раз превышать исходные титры антител против стрептокиназы. У части больных

Таблица 13.2

Сравнительная характеристика основных тромболитических препаратов

Показатель	Стрептокиназа	Урокиназа	ТАП (альтеплаза)
Молекулярная масса, Д	47 000	33 000–54 000	70 000
$t_{1/2}$, мин	15–25	15–20	4–8
Связывание с плазминогеном	Непрямое	Прямое	Прямое
Избирательная активность в отношении фибрина	Минимальная	Умеренная	Умеренная
Антигенные свойства	Да	Нет	Нет
Риск развития гипотонии	Да	Да	Да
Кровотечение как главный побочный эффект	Да	Да	Да
Патентованные названия	Стрептаза Авелизин Кабикиназа Целиаза	Аббокиназа Урокидан	Активаза Актилиза

титры антистрептокиназных антител возвращаются к исходному уровню (до её введения) через 6 месяцев, однако во многих случаях титры этих антител остаются повышенными у больных, получавших стрептокиназу 2–4 года назад, обусловливая резистентность к повторному введению препарата, а также аллергические реакции.

В настоящее время создан препарат стрептокиназы пролонгированного действия — стрептодеказа. Он является препаратом иммобилизованной стрептокиназы на водорастворимой матрице полисахаридной природы. После однократного введения стрептодеказы фибринолитический эффект сохраняется 48–72 ч. При повторном введении высока вероятность развития аллергической реакции, поэтому препарат вводят с интервалом в 6 месяцев.

Эффективным физиологическим активатором плазминогена является урокиназа — фермент, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 54000 Да.

Существенный недостаток стрептокиназы и урокиназы — они активируют плазминоген, который циркулирует в крови, поэтому могут провоцировать повышенную кровоточивость. Тканевой активатор плазминогена (ТАП), лишённый этого недостатка, получен рекомбинантным методом, но его широкое применение сдерживает высокая цена.

ТАП представляет собой сериновую протеазу с молекулярной массой 72 000 Да, которая синтезируется преимущественно эндотелиальными клетками сосудов. В кровяное русло ТАП секретируется в виде одноцепочечной молекулы (молекулярная масса 70 000 Да), которая превращается в двухцепочечную под действием плазмина, трипсина, калликреина или фактора Ха свёртывающей системы крови. Важным свойством ТАП является его очень высокая избирательность в отношении связанного с фибрином плазминогена, что обеспечивает его преимущественную активацию на поверхности фибринового тромба. Правда, эта избирательность в значительной мере утрачивается, когда ТАП используется в терапевтических дозах.

ТАП не обладает антигенными свойствами и не оказывает существенного влияния на гемодинамику; пирогенные и аллергические реакции в ответ на введение ТАП встречаются редко.

ТАП выделяют из ткани матки человека и культуры клеток человеческой меланомы. В последние годы для клинического применения ТАП получают ДНК-рекомбинантным методом. В медицинской литературе препарат одноцепочечного ТАП, полученного рекомбинантным методом, получил название альтеплаза (alteplase), а двухцепочный ТАП — дутеплаза (duteplase). Альтеплаза выпускается под патентованными названиями: активаза (activase) и актилиза (actilyse).

Экспериментальные исследования свидетельствуют о более высокой тромболитической активности ТАП по сравнению со стрепто- и урокиназой. В остром периоде ИМ рекомбинантный ТАП быстрее и чаще вызывает лизис окклюзирующего тромба в инфарктсвязанной коронарной артерии. ТАП более эффективно снижает раннюю смертность у больных ИМ, чем стрептокиназа, однако чаще вызывает внутричерепные кровоизлияния.

13.3. Антифибринолитические средства

Антифибринолитические вещества назначают после травм, хирургических вмешательств, при циррозе печени, маточных кровотечениях, передозировке фибринолитических веществ, когда активность системы фибринолиза повышается. Однако ингибиторы фибринолиза следует с большой осторожностью использовать для лечения геморрагических осложнений тромболитической терапии, учитывая повышенный риск развития повторного тромбоза, особенно у больных острым ИМ. Применение ингибиторов фибринолиза оправдано лишь при кровотечениях, угрожающих жизни больного.

Наиболее широко используется синтетический препарат — аминокапроновая кислота. По химическому строению это аналог лизина; ингибирует образование плазмина под действием эндогенных активаторов плазминогена, ингибитор стрептокиназы и урокиназы. Пара-аминометилбензойная кислота (ПАМБК) представляет собой активное антифибринолитическое средство, которое в 3 раза превышает активность аминокапроновой кислоты. Период полураспада его значительно короче, оно обладает малой токсичностью, и его доза может увеличиваться до тех пор, пока ингибиция фибринолиза не достигнет 80%. ПАМБК обладает малой токсичностью и по антифибринолитической активности примерно в 3 раза превосходит ЭАКК. ПАМБК вводят внутривенно капельно по 1–3 г 3–4 раза в день.

Транексамовая кислота — ингибитор фибринолиза, который в 10 раз активнее аминокапроновой кислоты. Выявлено, что этот препарат способен предотвращать кровотечения у страдающих гемофилией, значительно снижает кровопотерю при эссенциальной геморрагии и хирургических вмешательствах. Применяется внутривенно капельно по 1–1,5 г 3 раза в день.

Апротинин — природный ингибитор протеолитических ферментов.

Контролируемые исследования по изучению эффективности и безопасности ингибиторов фибринолиза при лечении кровотечений у больных острым ИМ, получавших тромболитическую терапию, не проводились. Однако результаты двух многоцентровых исследований, посвящённых лечению субарахноидального кровоизлияния, вызванного разрывом аневризмы мозговой артерии, свидетельствуют, что антифибринолитические препараты, снижая смертность от повторного кровотечения, одновременно повышают риск развития ишемического тромботического инсульта.

Ингибиторы фибринолиза иногда сочетают с инфузиями свежезамороженной плазмы. При необходимости переливания крови предпочтительнее использовать свежую кровь.

Протамина сульфат образует комплексное соединение с гепарином и НМГ и инактивирует их. Используют как антидоты при необходимости быстрого устранения действия гепаринов и купирования вызванных последними кровотечения.

13.4. Антитромбоцитарные средства

Антитромбоцитарные средства назначают для профилактики и терапии артериального тромбоза: в постинфарктном периоде, после операций на сердце и сосудах (ангиопластика, аортокоронарное шунтирование). Основной причиной артериального тромбоза является разрыв или эрозия покрышки атеросклеротической бляшки. Тромбы, образующиеся в артериях, пристеночные, белого цвета, состоят преимущественно из тромбоцитов и лейкоцитов. Вызывая окклюзию артерии, они способствуют ишемии и некрозу участков ткани, получающих кровоснабжение из этого сосуда (инфаркт ткани).

В неповреждённом сосуде тромбоциты не взаимодействуют друг с другом и не адгезируют за счёт электростатического отталкивания тромбоцитов от эндотелия. Реакция тромбоцитов на внешние стимулы определяется соотношением внеклеточных сигналов — активирующих и ингибирующих активность клеток. Физиологические стимуляторы активности тромбоцитов могут быть разделены на 2 группы: 1) слабые агонисты — АДФ (в концентрации < 1 мкМ), вазопрессин, адреналин, серотонин; 2) сильные агонисты — тромбин, коллаген, тромбоксан A_2, фактор активации тромбоцитов, АДФ (> 5 мкМ). К антагонистам относятся: простагландин I_2 (простациклин, $ПГI_2$), простагландин $Д_2$ ($ПГД_2$), NO (окись азота, эндотелиальный релаксирующий фактор). Их также можно классифицировать по происхождению: плазменные компоненты (тромбин, плазмин, катехоламины), васкулярные ($ПГI_2$, NO, коллаген), тромбоцитарные (АДФ, серотонин, $ТхА_2$, ФАТ).

На действие агонистов тромбоцит отвечает по следующей схеме.

1. Изменение формы, или процесс сфероляции. В спокойном состоянии они дисковидной формы, при незначительной стимуляции их форма изменяется от эллипсовидной до сферической с выростами в виде псевдоподий.
2. Развитие адгезивности — способности тромбоцитов прилипать к субэндотелию или искусственной поверхности, например к стеклу.
3. Обратимая агрегация, сопровождающаяся образованием микроагрегатов, которые содержат от 3 до 20 пластинок.
4. Реакция дегрануляции — выброс содержимого гранул.
5. Необратимая агрегация клеток.

В зависимости от выраженности тромбоцитарные ответы могут быть разделены на 3 типа.

Первый тип — обратимый ответ, который включает первые три стадии активации и реализуется при действии слабых агонистов. В этом случае полной активации не происходит — тромбоцитарный агрегат распадается, тромбоциты могут вернуться в своё первоначальное дисковидное состояние. Второй тип — необратимый ответ тромбоцитов на действие сильных агонистов, которые вызывают выброс содержимого α-гранул, плотных гранул и необратимую агрегацию.

Третий тип — реакция дезагрегации, индуцируемая антагонистами. В месте образования сосудистого дефекта (в результате механического повреждения, повреждающего воздействия химического вещества, изъязвления атеросклеротической бляшки) экспонируются молекулы адгезии эндотелиального происхождения — фибронектин, ламинин, фактор Виллебранда, витронектин и др. Адгезивные белки служат центрами «притяжения» циркулирующих в крови тромбоцитов, которые несут на своей поверхности участки связывания (интегриновые молекулы) соответствующих

факторов адгезии. По своей химической природе интегрины представляют собой нековалентные комплексы различных типов гликопротеиновых молекул. Установлено, что узнающий сайт для большинства интегринов, который связывает тромбоцитарные и экстраклеточные компоненты, — трипептид *arg-gly-asp*.

Взаимодействие фактора Виллебранда с тромбоцитами опосредовано гликопротеиновыми (ГП) комплексами — ГП Ia и ГП Ib. Фактор Виллебранда представляет собой гликопротеин молекулярной массой 1000 кДа. Он синтезируется васкулярными эндотелиальными клетками, а также в небольшом количестве присутствует в тромбоцитах и плазме крови. Снижение концентрации этого фактора или его функциональная пассивность вызывают нарушение адгезии тромбоцитов к субэндотелию и увеличение времени кровотечения. Такая картина характерна для наследственного геморрагического заболевания — болезни Виллебранда. Недостаток ГП Ib определяет другую наследственную патологию — болезнь Бернара–Сулье. В этом случае не происходит связывания фактора Виллебранда с тромбоцитами, нарушается адгезия. При ишемической болезни сердца, атеросклерозе, сахарном диабете наблюдается увеличение адгезивности, механизм которой пока неизвестен. Полагают, что важную роль в этом случае может играть недостаточная продукция простациклина.

Фиксация тромбоцита к повреждённым структурам сосуда создаёт предпосылки для эффективного взаимодействия тромбоцита с главным белком соединительной ткани — коллагеном. Последовательность биохимических событий, лежащих в основе индуцированной коллагеном активации тромбоцита, приведена на схеме: реакция тромбоцитарного звена включает 5 последовательных стадий (рис. 13.8), для каждой из них найдены специфические блокаторы.

Инициация активации тромбоцитарного звена гемостаза обусловлена образованием комплекса коллагена со специфическим мембранным рецептором коллагена. Результатом этого взаимодействия является активация мембраносвязанного фермента фосфолипазы A_2 с образованием двух продуктов — арахидоновой кислоты (АК) и лизо-ФАТ. Субстратом этой реакции служит молекула фосфолипида (ФЛ), содержащего во втором положении глицеринового остатка арахидоновую кислоту. Чаще всего в качестве субстрата выступает фосфатидилхолин (ФХ), который содержится преимущественно во внешнем слое цитоплазматической мембраны (ПМ) тромбоцита; на долю ФХ приходится примерно 26% от общего содержания липидов в ПМ. Под действием фермента циклооксигеназы АК быстро конвертируется в циклические эндоперекиси — простагландин G_2 и простагладин H_2 — короткоживущие высокореакционные соединения, которые по механизму отрицательной обратной связи ингибируют активность циклооксигеназы. Продуктом реакции, катализируемой ферментом тромбоксансинтетазой, является тромбоксан A_2(TxA_2) — мощный индуктор агрегации и вазоконстриктор. Другой сильный индуктор агрегации — фактор активации тромбоцитов (ФАТ) — образуется из промежуточного соединения лизо-ФАТ путём ферментативного ацетилирования с помощью ацетилтрансферазы.

Наряду с коллагеном, важным физиологическим индуктором агрегации тромбоцитов является тромбин, который образуется на конечных этапах внешнего и внутреннего путей коагуляции.

Интактные эндотелиальные клетки связывают циркулирующий тромбин, вызывая его инактивацию. Мембранные участки связывания тромбина на ПМ эндотелия известны под названием тромбоглобулинов. Каскадный механизм свёртывающей системы крови, генерирующий тромбин, включает активацию протромбина на поверхности тромбоцитов. В этом процессе участвуют ионы кальция и отрицательно заряженные тромбоцитарные ФЛ. Кислые ФЛ (фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол), находящиеся на внутренней стороне ПМ тромбоцитов, экспонируются в результате индуцированного коллагеном разрушения и деградации тромбоцитов. Точкой прило-



Рис. 13.8. Точки приложения действия антитромбоцитарных лекарственных веществ

жения действия тромбина служит фосфолипаза A_2 (дальнейшая цепь событий аналогична описанной для коллагена). Стимулирующее влияние тромбина может быть ограничено применением специфических антагонистов рецепторов тромбина на ПМ тромбоцитов. Однако этот метод фармакологического воздействия находится только на начальных этапах исследования. Значительно более изучены способы, ведущие к снижению эффективной концентрации тромбина в плазме крови. К лекарственным препаратам, ингибирующим образование тромбина или его активность, относятся гепарин, гепаринсульфат, гирудин, арготробан.

Таким образом, в ходе первой стадии активации тромбоцитов образуются два активных индуктора, при этом одна молекула коллагена стимулирует синтез примерно 1000 молекул ФАТ и TxA_2.

Основные принципы каскадного механизма активации тромбоцитов — усиление активирующего сигнала и его дивергенция — находят отражение и на последующих стадиях активации. Следует отметить, что стадия I обычно не сопровождается заметными изменениями формы и адгезивных способностей тромбоцитов.

Терминация стимулирующего сигнала TxA_2 и ФАТ осуществляется путём их метаболизма ферментами, максимальное содержание которых обнаружено в лёгких. В результате быстрой инактивации период полужизни ($t_{1/2}$) эйкозаноидов не превышает 1 мин.

К фармакологическим соединениям, ингибирующим данную стадию активации тромбоцитов, относятся:

— синтетические пептиды — конкурентные ингибиторы связывания фибронектина, фактора Виллебранда и витронектина с тромбоцитами — тетрапептид *arg-glu-asp-val* (REDV);

— моноклональные антитела к узнающим интегриновым сайтам;

— ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ), которые в зависимости от механизма действия, делятся на препараты необратимого типа действия: ацетилсалициловая кислота и обратимые ингибиторы циклооксигеназы.

Приём 500 мг аспирина приводит к инактивации ЦОГ всех циркулирующих тромбоцитов крови. Аспирин инактивирует фермент путём ацетилирования серинового остатка (*ser* 229), содержащегося в активном центре ЦОГ. Поскольку отсутствие ядра не позволяет тромбоцитам ресинтезировать новый фермент, они теряют способность продуцировать эйкозаноиды, и прежде всего $ТхА_2$. Аспирин также угнетает активность ЦОГ эндотелиальных клеток, но они способны регенерировать новый фермент в течение нескольких часов. Поэтому идеальная терапия аспирином предполагает использование низких доз препарата, при которых ингибируется синтез $ТхА_2$ в тромбоцитах и быстро восстанавливается синтез $ПГИ_2$ в эндотелии. Этому условию соответствует приём 75 мг аспирина в день. Свойством обратимо ингибировать тромбоцитарную ЦОГ обладают нестероидные противовоспалительные средства — фенилбутазон, индометацин, индобуфен, фенопрофен, напроксен, тепоксалин.

— ингибиторы тромбоксансинтетазы — производные имидазола — дазоксибен, бензидамин, гидроксипростаноевая кислота, препараты U-51605, L-8027.

Ауто- и паракринный механизмы активации тромбоцитов под действием ФАТ и $ТхА_2$ опосредованы специфическими мембранными рецепторами и определяются стимуляцией активности мембраносвязанного фермента фосфолипазы С. Результатом ферментативного гидролиза минорного фосфолипида фосфатидилинозитолдифосфата ($ФИФ_2$) является образование двух соединений — 1,4,5-инозитолтрифосфата ($ИФ_3$) и диацилглицерина (ДАГ), обладающих свойствами вторичных внутриклеточных посредников. $ИФ_3$ — гидрофильное соединение, которое мобилизует ионизированный Са из его внутриклеточных депо: плотной тубулярной системы (ПТС) и других структурных образованиях эндоплазматического ретикулума тромбоцитов. В покоящихся тромбоцитах базальный уровень Са не превышает 80 нМ, при этом выделяют два его пула:

1) цитозольный пул ($t_{1/2} \approx 17$ мин), регулируемый трансмембранным обменом Na/Ca;

2) медленно изменяющийся пул ($t_{1/2} \approx 300$ мин), который зависит от активности Ca/Mg-АТФазы и локализуется в ПТС.

$ИФ_3$, связываясь с рецептором ПТС, открывает pH-чувствительный Са-канал. АТФ является кофактором, в присутствии которого вероятность открывания каналов увеличивается. Использование метода stop-flow флуориметрии позволило предположить существование ещё одного пула кальция в тромбоцитах. Это мембраносвязанный кальций ПТС, который высвобождается при активации слабыми агонистами.

Молекулярной мишенью действия ДАГ служит мультифункциональный мембраносвязанный фермент протеинкиназа С (ПК С), осуществляющий фосфорилирование различных внутриклеточных белков по сериновым и треониновым остаткам. Регуляторная роль ПК С сводится к запуску внутриклеточных механизмов снижения концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме тромбоцита ($[Ca^{2+}]_{вн}$). Эти механизмы включают фосфорилирование и последующее ингибирование активности рецепторуправляемых Са-каналов ПМ. Примером отрицательной обратной связи служит активация под действием ПК С фермента 3-фосфомоноэстеразы (3-ФМЭ), участвующего в метаболизме $ИФ_3$ до $ИФ_2$.

Интересно, что синтетические аналоги ДАГ — форболовые эфиры — обладают способностью вызывать агрегацию тромбоцитов, что связывают с активацией $ФЛА_2$. В то же время инкубация тромбоцитов с форболмиристатацетатом (ФМА) или синтетическим ДАГ приводит к частичному ингибированию клеточных ответов на тромбин, ФАТ, другие активаторы тромбоцитов. Показано, что оборот $ФИФ_2$, $ИФ_3$, Са-мобилизация ослаблены после прямой стимуляции ПК С. Ингибиторы ПК С устраняют супрессирующий эффект форболовых эфиров на ФЛ С-зависимую активность. Более того, в работах последних лет установлено, что в тромбоцитах ПК С не только блокирует рецепторзависимое увеличение $[Ca^{2+}]_{вн}$, но и переключает чувствительность с агонистов, активирующих Са-зависимые реакции (секрецию, агрегацию), на агонисты, действующие через цАМФ.

Таким образом, ключевым звеном II стадии активации тромбоцитов является мобилизация ионов Са из внутриклеточных депо; ионизированный кальций — основной регулятор последовательности тромбоцитарной активации.

Фармакологическая регуляция активности тромбоцитов на данном этапе включает воздействие на рецепторы ФАТ, $ТхА_2$ и внутриклеточный обмен ионов Са:

— антагонисты ФАТ — препараты CV-3988, AG-6-C, AG-10-C — структурные аналоги этого соединения; вещество BN-52021 и кадсуренон угнетают связывание меченого ФАТ с соответствующим рецептором;

— антагонисты рецепторов $ТхА_2$ — (3-пиридинил)алканоевые и (арилсульфониламино)алканоевые кислоты, препараты ридогрел, вапипрост, изопростан. Проведённые клинические испытания продемонстрировали эффективность этих классов соединений *in vivo* при ангиопластике, сахарном диабете, беременности, гипертензии, кардио- и цереброваскулярных заболеваниях, сопровождающихся увеличением продукции тромбоксана;

— ингибиторы фосфоинозитидного обмена — соединения лития;

— хелаторы внутриклеточного Ca^{2+} — ВАРТА и её флуоресцирующие производные Quin-2, Fura-2. Особенно выражены комплексообразующие свойства у ВАРТА — структурного аналога кальциевого комплексона ЭГТА.

К основным внутриклеточным процессам, которые находятся под контролем внутриклеточного уровня кальция, относятся: положительная модуляция активности мембранных фосфолипаз $А_2$ и С; экспрессия на поверхности клетки гликопротеиновых рецепторов фибриногена, интегриновых комплексов (экспозиция некоторых факторов адгезии не является Са-зависимым процессом); ингибирование аденилатциклазного и гуанилатциклазного путей, тормозящих стимуляцию тромбоцитов; работа сократительного аппарата тромбоцитов, которая определяет изменение формы тромбоцита, адгезивную активность, секрецию и высвобождение содержимого внутриклеточных гранул. Для проявления влияния Ca^{2+} на большинство из перечисленных процессов необходимо предварительное образование комплекса 4 ионов кальция с кальмодулином — специфическим кальцийсвязывающим белком, относящимся к семейству белков S-100. Образованный комплекс (Са–КМ) обладает способностью активировать киназу лёгких цепей миозина, стимулируя секрецию и дегрануляцию. Другими мишенями действия Са–КМ являются аденилатциклаза и гуанилатциклаза, фосфорилирование которых Са–КМ-зависимыми протеинкиназами вызывает снижение их ферментативной активности и последующее уменьшение внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов — цАМФ и цГМФ соответственно. Взаимодействие комплекса Са–КМ с фосфодиэстеразой цАМФ, напротив, приводит к стимуляции активности этого фермента и, как следствие, ускоренному метаболизму цАМФ до неактивного соединения АМФ.

Антагонисты кальмодулина — производные 1,4-дигидропиридина, фенотиазина (трифтазин), нафтилсульфонамидов (наиболее активный препарат W-7) вызывают

конформационные изменения в молекуле кальмодулина, нарушая его способность связывать Ca^{2+}. Угнетение функциональной активности тромбоцитов у этих соединений соответствует степени сродства к кальмодулину.

III стадия соответствует фазе первичной (обратимой) агрегации тромбоцитов. Возможность перехода тромбоцитов из III в IV стадию активации определяется как внутриклеточными механизмами регуляции, которые снижают $[Ca^{2+}]_{вн}$, так и тормозными экстраклеточными стимулами, действие которых реализуется через аденилатциклазную и гуанилатциклазную системы трансдукции сигнала. Если рассматривать экстраклеточный уровень, то ведущее значение здесь имеют простациклин и NO. В тромбоцитах эту тормозящую роль играют цАМФ и цГМФ.

Простациклин постоянно синтезируется клетками эндотелия в кровоток. Связываясь со специфическими рецепторами на мембране тромбоцитов, он активирует АЦ, повышает внутриклеточное содержание цАМФ и снижает концентрацию ионов кальция. Синтез простациклина в клетках эндотелия включает те же реакции, что и синтез $ТхА_2$ в тромбоцитах; отличие проявляется на заключительной стадии синтеза, когда под действием простациклинсинтетазы $ПГН_2$ превращается в $ПГI_2$.

Переход ГТФ в цГМФ катализирует гуанилатциклаза. Увеличение внутриклеточного содержания цГМФ ингибирует последующие тромбоцитарные ответы через угнетение активности ФЛС. Указанный путь торможения агонистиндуцированного ответа тромбоцитов характерен для NO, который вызывает селективную активацию ГЦ, связываясь с гемовой группировкой этого фермента. NO-синтетаза присутствует в различных клетках, включая макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, тромбоциты. Этот фермент, используя L-аргинин как субстрат, генерирует NO и L-цитрулин в качестве метаболита. Метиловый эфир L-аргинина — специфический ингибитор NO-синтетазы.

Основной путь снижения $[Ca^{2+}]_{вн}$ — активация Ca-АТФаз ПТС и ПМ, уменьшающих внутриклеточный уровень кальция за счёт его обратного захвата во внутриклеточные депо (ресеквестрация) и выброса Ca^{2+} из клетки. Кальцийблокирующий эффект циклических нуклеотидов опосредован специфическими цАМФ- и цГМФ-зависимыми протеинкиназами. В то же время не исключается, что часть эффектов циклических нуклеотидов определяется их прямым воздействием на активность ПК С, фосфолипазы С и $А_2$.

Стимуляторы АЦ и ГЦ ведут к быстрому снижению $[Ca^{2+}]_{вн}$, они способны блокировать активацию тромбоцитов на любой её стадии. Напротив, способность адреналина вызывать агрегацию тромбоцитов обусловлена снижением активности АЦ, опосредованным α_1-адренорецепторами.

Фармакологичекую блокаду III стадии активации тромбоцитов способны вызывать соединения, повышающие внутриклеточный уровень циклических нуклеотидов. В зависимости от молекулярного механизма действия можно выделить следующие группы препаратов:

— активаторы аденилатциклазы — аденозин, форсколин, $ПГЕ_1$, $ПГD_2$, стабильный аналог простациклина — эпопростенол;

— дипиридамол, который по механизму действия относится к конкурентным блокаторам захвата аденозина различными типами клеток и пролонгирует антиагрегационное действие аденозина;

— активаторы ГЦ — органические нитраты и нитросодержащие препараты, такие как нитроглицерин, изосорбид мононитрат, нитропруссид натрия, молсидомин, которые успешно используются при кардиоваскулярных расстройствах, но концентрации этих препаратов, способные ингибировать активность тромбоцитов, существенно выше терапевтических; их положительный эффект объясняется скорее вазодилатацией;

— препараты, повышающие уровень цАМФ путём подавления активности ФДЭ-цАМФ; к ингибиторам этого фермента относят цилостамин, производные ксантина — пентоксифиллин, кофеин, теофиллин.

В ходе реакции высвобождения из тромбоцитов через открытую канальцевую систему выделяются аденозиндифосфат (АДФ), ФАТ, вазопрессин, серотонин, адреналин, $ТхА_2$, которые вовлекают в процесс агрегации другие тромбоциты. $ТхА_2$ и серотонин (посредством активации $5\text{-}НТ_{2А}$-рецепторов), обладая вазоконстрикторным действием, обусловливают скопление тромбоцитов в месте повреждения, локализуя процесс.

Для развития необратимой агрегации важным событием является высвобождение во внеклеточное пространство АДФ. Мембранные рецепторы АДФ относятся к классу $Р_{2х}$-пуриновых рецепторов, которые одновременно являются Са-каналами. Активация этих рецепторов открывает доступ к неисчерпаемому источнику внеклеточного кальция, вызывая вход в клетку Ca^{2+} по градиенту концентрации.

К фармакологическим соединениям, ингибирующим данную стадию активации тромбоцитов, относятся:

— препараты, вызывающие деструкцию сократительного аппарата, — винкристин, колхицин, цитохолазин;

— селективный антагонист пуриновых рецепторов — ANAAPP3;

— блокаторы кальциевых каналов — верапамил, нифедепин, дилтиазем, преniламин.

Конечные этапы активации тромбоцитов связаны с экспозицией на поверхности тромбоцитов рецепторов фибриногена — гликопротеинового комплекса IIb–IIIa.

Препарат клопидогрел ингибирует экспрессию ГП IIb–IIIa и блокирует трансформацию этого комплекса в высокоаффинный лигандсвязывающий сайт.

В отдельных случаях используют антиагреганты для внутривенногов введения, способные блокировать конечный путь агрегации тромбоцитов (препятствующие взаимодействию ГП IIb–IIIa, расположенных на поверхности тромбоцитов, с фибриногеном), — абциксимаб и эптифибатид.

Каскадная система включения и активации факторов, регулирующих внутриклеточную концентрацию ионов кальция — основного индикатора активности тромбоцитов, отличается надёжностью и динамичностью. Для неё характерны множественность путей проведения сигнала, дублирование и взаимозаменяемость элементов, быстрый возврат к равновесному состоянию. Этим объясняется сложность адекватного фармакологического вмешательства в работу каскадной системы активации тромбоцитов. Клопидогрел, воздействующий на конечный этап активации тромбоцитов, является одним из самых эффективных антитромбоцитарных препаратов.

Более детальное изучение механизмов передачи сигнала, системы вторичных мессенджеров, принципов регуляции Са-обмена в тромбоцитах позволит ближе подойти к созданию высокоспецифичных и малотоксичных препаратов нового поколения.

13.5. Лекарственные средства, применяемые для лечения больных гемофилией А

Гемофилия — один из тяжёлых врождённых геморрагических диатезов, наследуемых по рецессивному признаку, сцепленному с половой Х-хромосомой, и поражающих преимущественно лиц мужского пола. Различают два типа гемофилии — гемофилия А (дефицит фактора VIII) и гемофилия В (дефицит фактора IX). Первый тип встречается в 80% случаев, второй — в 20% случаев. Заместительная терапия повышает уровень фактора VIII в плазме крови, что временно корригирует его

дефицит в плазме крови и препятствует кровоточивости. При этом заболевании удлиняются время свёртывания крови, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), нормальное время кровотечения и протромбиновое время. Тип и тяжесть гемофилии определяются на основании степени снижения коагуляционной активности антигемофильных глобулинов (фактор VIII и фактор IX) в плазме с помощью специфических коагулогических методов.

Существует несколько форм гемофилии:

— тяжёлая форма — с уровнем фактора VIII/IX 0–3%;

— средней тяжести — с уровнем фактора VIII/IX 3,1–5%;

— лёгкая форма — с уровнем фактора VIII/IX более 5%;

— ингибиторная форма — наличие ингибиторов к VIII/IX фактору.

Заместительная терапия препаратами фактора VIII при гемофилии, позволяющая восполнить его дефицит в плазме до необходимого уровня, до настоящего времени является основным методом профилактики и лечения кровотечений различной локализации у больных гемофилией. Одна единица фактора свёртывания (1 МЕ или ЕД), введённая из расчёта на 1 кг массы тела больного, повышает активность фактора VIII в плазме на 2% при гемофилии А. Больным гемофилией А и В проводится заместительная гемостатическая терапия концентратами VIII и IX факторов соответственно в дозе 25–30 МЕ/кг 2–3 раза в неделю в зависимости от эффективности проводимого лечения. При острых гемартрозах в начальной стадии вводится лиофилизат фактора из расчёта 15 МЕ/кг каждые 12 ч, при поздней стадии — доза увеличивается до 30 МЕ/кг с повторным введением через 12–24–36–48 ч до исчезновения болей. При стационарном экстренном лечении проводится в срочном порядке гемостатическая терапия путём введения больным фактора VIII в дозе 40–70 МЕ/кг.

Данная терапия не исключает опасность развития такого серьёзного иммунного осложнения, как ингибиторная форма гемофилии, при которой вводимый больному фактор свёртывания крови быстро инактивируется ингибитором и стимулирует синтез новых антител. В основе этой патологии лежит появление антител к фактору VIII. По некоторым данным, ингибитор при гемофилии А встречается у 5–15% пациентов. При профилактическом лечении гемофилии А фактором VIII (C. Hay и др., 2006) у 20–30% пациентов наблюдается наличие нейтрализующих антител (ингибиторов). Как правило, при первых эпизодах появления ингибитора у больного отсутствует эффект от гемостатической терапии, кровотечение приобретает неконтролируемый характер, возникают новые локализации кровотечений. Чаще всего ингибиторы появляются в раннем возрасте и, как правило, после нескольких инфузий фактора VIII. Процесс взаимодействия ингибиторов с факторами свёртывания крови идентичен реакции между антителом и антигеном. Разрушение молекулярных структур факторов свёртывания ингибитором происходит путём обычных иммунных реакций. Скорость разрушения факторов зависит от концентрации ингибитора. Антикоагулянтное действие ингибиторов определяют *in vitro* методом Бетезда. Титр ингибитора определяется в единицах Бетезда (ЕД/мл) и может составлять от нескольких единиц до ста и тысячи единиц, что имеет большое значение для выбора дозы применяемого препарата.

При недостаточной очистке препараты фактора VIII содержат также белки с активностью фактора Виллебранда (vWF). Прокоагулянтная активность характерна для низкомолекулярного фрагмента (фактора VIII), что важно для образования активного тромбопластина в начальной стадии первой фазы свёртывания крови. Высокомолекулярный фрагмент представлен фактором Виллебранда, который принимает участие в регуляции взаимодействия между тромбоцитами и стенкой сосуда и осуществлении первичного гемостаза *in vivo*. Фактор VIII синтезируется в виде одноцепочечного белка (300 кДа; 2332 пары оснований), имея внутреннюю последо-

вательность гомологов в виде А-доменов, двух С-доменов и большого В-домена. Действие большинства ингибиторов направлено против эпитопов, расположенных на A_2-, A_3- или C_2-доменах фактора VIII. У больных гемофилией, инфицированных ВИЧ, отмечены исчезновения антител при низком и высоком титрах ингибитора, что даёт ещё одно основание предположить значительную роль Т-лимфоцитов в развитии ингибитора, а также подтверждает возможность развития толерантности к вводимому фактору VIII. Ряд генетических особенностей пациентов обусловливает более высокую частоту появления ингибитора. К ним относятся: семейная предрасположенность, этнические факторы, некоторые типы HLA-антигенов II класса, мутации гена фактора VIII в виде инверсии интрона 22, точечных мутаций с образованием стоп-кодонов. Важно также отметить факт появления ингибиторов к фактору VIII при различных иммунных заболеваниях. Некоторые авторы связывают появление ингибиторов с технологическими особенностями производств высокореакционноспособных химических соединений при ряде химических производств. При наличии ингибиторов к фактору VIII необходимо проводить иммунотолерантную терапию (ИТТ), позволяющую элдиминировать антитела, возникающие при гемофилии (C. Hay и др., 2006).

В настоящее время имеется достаточное количество препаратов фактора VIII (табл. 13.3). По данным Л. А. Якуниной и др. [41], из представленных средств только криопреципитат не может рассматриваться как современный антигемофильный препарат, поскольку не соответствует основным требованиям, предъявляемым к препаратам для пожизненной заместительной терапии. Ему присущи нестабильность состава препарата, частое развитие ингибиторных форм, возможность гемотрансфузионных осложнений, угроза инфицирования вирусами гепатита В, С и ВИЧ, невозможность проведения профилактического и домашнего лечения.

Остальные препараты фактора VIII позволяют проводить эффективную терапию при гемофилии А, ингибиторных формах заболевания. С их помощью можно проводить профилактическое лечение, которое предотвращает артропатию, обеспечивает полноценное качество жизни больного и позволяет рассматривать гемофилию не как болезнь, а как корригируемый дефект в системе свёртывания крови. Однако они отличаются по своей способности обеспечивать вирусную безопасность гемостатической терапии.

Поскольку все перечисленные препараты фактора VIII, за исключением Когенэйта ФС, получаются путём различных методов очистки из плазмы крови человека, нельзя исключить присутствия в них известных или неизвестных вирусов. Процедуры инактивирования/удаления вирусов в процессе получения данных препаратов могут иметь ограниченную эффективность против неинкапсулированных вирусов, одним из которых является парвовирус В19. Поэтому такие вирусы, как парвовирус В19 или вирус гепатита А, чрезвычайно сложно удалить или инактивировать. Парвовирус В19 может вызвать развитие внутриутробной инфекции у серонегативных беременных женщин, а также у лиц с иммунодефицитом или эритроцитозом (в том числе при гемолитической анемии). Симптомы парвовирусной инфекции включают лихорадку, сонливость, озноб, ринит и через 2 недели — сыпь, артралгию. Симптоматика гепатита А может включать плохой аппетит, слабость, субфебрилитет, тошноту, рвоту, боли в правом подреберье, потемнение мочи и желтушность кожных покровов и слизистых оболочек. Пациент должен немедленно обратиться к врачу при появлении указанных симптомов. Больным, получающим лечение фактором VIII свёртывания крови, приготовленным из плазмы, рекомендована вакцинация против гепатитов А и В.

В связи с опасностью возможного присутствия вирусов в препаратах фактора VIII, полученных из плазмы крови людей, перед учёными была поставлена задача разработки новой технологии приготовления препаратов, исключающих такой риск. Эта задача была успешно разрешена с помощью генно-инженерной технологии получения

Таблица 13.3

Препараты фактора свёртывания крови VIII

Торговое название	Состав	Показания	Противопоказания	Побочные эффекты
Эмоклот Д. И., лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Кедрион С. п. А., Италия)	Комплекс факторов свёртывания VIII и Виллебранда. Приготовляется из плазмы человека. При использовании плазмы или продуктов, приготовленных из человеческой плазмы, нельзя полностью исключить передачу инфекционных агентов, в том числе пока ещё не известных	Лечение и профилактика кровотечений, вызванных наследственным и острым дефицитом фактора свёртывания крови VIII (гемофилия А, гемофилия А с ингибированием фактора свёртывания крови VIII, острый дефицит фактора свёртывания крови VIII вследствие спонтанного появления ингибитора фактора). Болезнь Виллебранда	Гиперчувствительность	Редко — аллергические реакции, повышение температуры тела. У пациентов с гемофилией А — появление антител (ингибиторов) к фактору свёртывания крови VIII, что проявляется в виде неэффективного клинического ответа
Гемофил М, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Бакстер Хелскэа Корпорейшн США). Монарк-М (Американский Красный Крест, Бакстер, США)	Белок, выделяемый из человеческой плазмы, которая может быть источником гепатита и других вирусных заболеваний; очистка осуществляется по М-методике иммунофильной хроматографией с использованием мышиных моноклональных антител к фактору VIII	Гемофилия А (профилактика и лечение кровотечений). Приобретённая коагулопатия, вызванная наличием ингибиторов фактора VIII (при концентрации ингибиторов не более 10 БЕ/мл)	Гиперчувствительность (в том числе к мышиному белку)	Аллергические реакции, тошнота, рвота, гипертермия, кожная сыпь

Таблица 13.3 (*продолжение*)

Торговое название	Состав	Показания	Противопоказания	Побочные эффекты
Иммунат, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Бакстер АГ, Австрия)	Комплекс факторов VIII и Виллебранда готовится из плазмы человека	Лечение и профилактика кровотечений, вызванных наследственным и острым дефицитом фактора VIII: гемофилия А, гемофилия А с ингибиторами фактора VIII, острый дефицит фактора VIII вследствие спонтанного появления ингибиторов фактора VIII. Болезнь Виллебранда с дефицитом фактора VIII	Гиперчувствительность	Редко — аллергические реакции (ангионевротический отёк, жжение в месте инъекции, озноб, гиперемия кожи, генерализованная сыпь, головная боль, снижение АД, сонливость, тошнота, рвота, беспокойство, тахикардия, стеснение в груди, покалывание), гипертермия. У пациентов с гемофилией А — появление антител (ингибиторов) к фактору VIII (выражается в виде неэффективного клинического ответа). При применении высоких доз — гемолиз у пациентов с группой крови А (II), В (III), АВ (IV)
Когенэйт ФС, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Байер Корпорейшн, США)	Высокоочищенный рекомбинантный гликопротеин, вырабатываемый культурой клеток почек хомячков, в которые был включён ген фактора VIII человека. В качестве стабилизаторов содержит сахарозу, глицин и гистидин	Лечение и профилактика кровотечений у больных гемофилией А, в том числе при проведении экстренного или планового хирургического вмешательства. Доказана эффективность и безопасность использования препарата у детей любого возраста, включая новорождённых и младенцев	Гиперчувствительность (в том числе к белкам мышей или хомячков)	В единичных случаях — воспалительные реакции в месте введения, головокружение, сыпь, необычный привкус во рту, умеренное повышение АД, зуд, деперсонализация, тошнота и ринит, образование антител к фактору свёртывания крови

Таблица 13.3 (*продолжение*)

Торговое название	Состав	Показания	Противопоказания	Побочные эффекты
Коэйт-ДВИ, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Байер Корпорейшн, США). Талекрис (Биотерапьютикс Инк, США)	Смесь фактора свёртывания VIII и фактора Виллебранда	Лечение и профилактика кровотечений на фоне гемофилии А (при проведении экстренного или планового хирургического вмешательства) и приобретённого дефицита фактора свёртывания VIII	Гиперчувствительность, ДВС-синдром и/или гиперфибринолиз	Аллергические реакции: ангионевротический отёк, жжение в месте введения, гиперемия кожи, крапивница, зуд кожи, озноб, головная боль, снижение АД, сонливость, тошнота, рвота, беспокойство, тахикардия, ощущение сдавления в грудной клетке, стридорозное дыхание, анафилактический шок. Гипертермия; при введении высоких доз у пациентов с группой крови А (II), В (III) и АВ (IV) — гемолиз
Октанат, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Октафарма Фармацевтика Продуктион мбХ, Австрия)	Белок, полученный из человеческой плазмы. Возможность передачи инфекционных агентов не может быть полностью исключена	Лечение и профилактика кровотечений на фоне гемофилии А (при проведении экстренного или планового хирургического вмешательства) и приобретённого дефицита фактора свёртывания VIII	Гиперчувствительность, возраст до 6 лет	Аллергические реакции (жжение в месте введения, озноб, «приливы» крови, крапивница, головная боль, снижение АД, апатия, тошнота, рвота, беспокойство, чувство сдавления грудной клетки, одышка, повышение температуры), редко — анафилактические реакции (в том числе шок). Гемолитическая анемия (обычно при использовании высоких доз препарата у больных с группами крови А, В, АВ по системе АВ0), тромбоз, развитие антител (ингибиторов) к фактору свёртывания крови VIII

Таблица 13.3 (*окончание*)

Торговое название	Состав	Показания	Противопоказания	Побочные эффекты
Гемоктин СДТ, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (Биотест Фарма ГмбХ, Германия)	Белок, полученный из человеческой плазмы. Возможность передачи инфекционных агентов не может быть полностью исключена	Профилактика и лечение кровотечений при врождённом (гемофилия А) и приобретённом дефиците антигемофильного фактора крови VIII. Лечение ингибиторной формы гемофилии А	Гиперчувствительность	Образование антител к фактору свёртывания крови VIII; в редких случаях (с частотой менее 0,1 %) — аллергические реакции (крапивница, сыпь, чувство сдавления в груди, стридорозное дыхание, снижение АД, анафилаксия); тошнота, рвота, головная боль; трансфузионные реакции — озноб, гипертермия (купируются введением препаратов Ca^{2+} и антигистаминными препартами).
Криопреципитат, раствор для инфузий (замороженный) (Станция переливания крови МУЗ, г. Рубцовск, Россия)	Смесь белков плазмы человека	Профилактика и лечение гемофилии А, болезни Виллебранда, кровотечений другой этиологии на фоне резкого снижения концентрации фактора VIII в плазме	Не установлено	Парестезии слизистой оболочки полости рта (лечения не требует, исчезает сразу по окончании трансфузии); при наличии в анамнезе реакций на трансфузию компонентов крови — озноб и гипертермия (купируются введением препаратов Ca^{2+} и антигистаминных средств), аллергические реакции, образование антител к фактору свёртывания крови VIII

белковых препаратов человека. Для этого оказались пригодными культивируемые клетки почек хомячков. В них путём трансфекции был внедрён ген клеток человека, кодирующий биосинтез фактора VIII. После наработки этого гликопротеина, его экстракции и очистки был получен пригодный для медицинского использования рекомбинантный фактор VIII, представляющий собой гликопротеин. Данный гликопротеин состоит из нескольких пептидов различной протяжённости, включающих пептид с молекулярной массой 80 кДа и субъединицу с молекулярной массой 90 кДа. Биологическая активность рекомбинантного фактора VIII не отличается от фактора VIII, присутствующего в плазме крови человека. Очень важно, что при получении лекарственной формы рекомбинантного фактора VIII используются только синтетические стабилизаторы (сахароза, гистидин, лизин), что исключает малейший риск присутствия каких-либо вирусных или иных инфекционных возбудителей, которые могут присутствовать в крови человека.

Лекарственная форма рекомбинантного фактора VIII, названная «Когенэйт ФС», представляет собой непирогенный лиофилизат — белый порошок с желтоватым оттенком. Содержание сахарозы в одном флаконе составляет всего 28 мг. Поэтому при внутривенном введении Когенэйта ФС не изменяется концентрация глюкозы, но увеличивается концентрация фактора VIII в плазме и временно устраняется дефект коагуляции у больных гемофилией А. Восстановление активности фактора VIII и его $t_{1/2}$ не изменялись на фоне 24 недель лечения препаратом, что указывает на сохранение его активности и отсутствие формирования антител к фактору VIII.

Период полужизни $t_{1/2}$ рекомбинантного фактора VIII составляет 13 ч. Доза, необходимая для восстановления гемостаза, должна подбираться индивидуально, в зависимости от степени кровотечения, наличия ингибиторов и требуемого уровня активности фактора VIII.

Согласно имеющимся рекомендациям, при малых кровотечениях (поверхностные геморрагии, ранние кровотечения, кровотечения в суставы) для достижения терапевтического уровня активности фактора VIII в плазме 20–40% доза составляет 10–20 МЕ/кг (если сохраняются симптомы продолжающегося кровотечения — вводят повторную дозу); при умеренно выраженных кровотечениях (кровоизлияния в мышцы, кровотечения в полость рта, явные гемартрозы, очевидная травма), а также при малых хирургических вмешательствах — соответственно 30–60% и 15–30 МЕ/кг (если необходимо повторяют введение в той же дозе через 12–24 ч); при выраженных и жизнеугрожающих кровотечениях (внутричерепные кровотечения, кровотечения в брюшную, грудную полости, ЦНС, ретрофарингеальное или ретроперитонеальное пространство, капсулу подвздошно-поясничной мышцы), а также при переломах, травмах головы — соответственно 80–100% и 40–50 МЕ/кг (повторная доза — 20–25 МЕ/кг каждые 8–12 ч); при обширных хирургических вмешательствах — 100%, предоперационная доза 50 МЕ/кг, следует убедиться в 100%-й активности до операции, повторную дозу вводят спустя 6–12 ч после операции, продолжая лечение в течение 10–14 дней до полного заживления.

В отличие от препаратов плазменной природы, для Когенэйта ФС доказана эффективность и безопасность использования препарата у детей любого возраста, включая новорождённых и младенцев.

Клинический эффект является наиболее важным в оценке эффективности лечения препаратом. Для достижения удовлетворительного клинического результата может понадобиться введение большей дозы, по сравнению с расчётной. Если при помощи рассчитанной дозы не удаётся контролировать кровотечение и достичь ожидаемой концентрации, у больного следует подозревать присутствие циркулирующего ингибитора к фактору VIII. Его наличие и количество (титр) должны быть подтверждены соответствующими лабораторными тестами. В случае наличия ингибитора требуемая

доза препарата существенно варьирует и определяется на основании клинического ответа. Некоторые пациенты с низким титром ингибитора (10 единиц Бетезда) могут успешно лечиться препаратом. У пациентов с более высокими титрами ингибитора может быть необходимо использование таких лекарственных средств, как концентрат комплекса фактора IX, антигемофильного фактора (свиного) или антиингибиторного комплекса.

Как уже указывалось, при наличии ингибиторов к фактору VIII рекомендуют проводить иммунотолерантную терапию (ИТТ). Ранее подобная терапия применялась при использовании препаратов фактора VIII плазменной природы, но недавно появились сведения, имеющие отношение к терапии рекомбинантным фактором VIII. По данным A. Rotino и др. (2006), для индукции иммунной толерантности можно использовать различные режимы лечения рекомбинантным фактором VIII (50 МЕ/кг через день — 200 МЕ/кг ежедневно). В среднем за 6 месяцев такой терапии иммунная толерантность была достигнута у 19 из 26 пациентов (73%). У пациентов с инверсией интрона 22 она была достигнута в 70% случаев, а с нулевыми мутациями гена фактора VIII — в 71% случаев. При изучении эффективности ИТТ у пациентов, которых лечили рекомбинантным фактором VIII, обнаружено, что предшествующее лечение их плазменным фактором не влияет на результаты (C. Barnes и др., 2006). У 79,3% из 29 пациентов, хорошо переносящих ИТТ (средняя её продолжительность составила 1,1 года), наблюдалось развитие адекватной иммунной толерантности, позволяющей проводить длительное лечение рекомбинантным фактором VIII.

Анализ показал, что после проведения 4160 инфузий Когенэйта ФС частота побочных эффектов составила 2,6%, но только 0,5% таких реакций можно было считать связанными с введением препарата. Такими реакциями были: головокружение (2), необычный вкус во рту (1), умеренное повышение АД (1), зуд (1), сыпь (2), тошнота (1), ринит (1), местные реакции (2). Ингибиторов фактора VIII не найдено у 72 ранее не леченных пациентов с тяжёлой формой гемофилии А, которым вводили Когенэйт ФС в среднем в течение 54 дней.

Важно подчеркнуть, что при проведении клинических испытаний Когенэйта ФС ни у одного пациента не найдено специфических антител против белков хомячков и крыс и не зарегистрировано каких-либо аллергических реакций, связанных с инфузией рекомбинантного фактора VIII. Однако пациентов следует предупреждать о теоретической возможности развития таких реакций, и при их возникновении они должны обратиться к врачу.

При проведении клинических испытаний Когенэйта ФС вводили 71 пациенту с гемофилией А (возраст 12–59 лет), которые ранее лечились препаратами фактора VIII, полученными из плазмы крови. Всего проверено 3995 инфузий Когенэйта ФС в течение 6 месяцев. Для лечения 659 случаев кровотечений потребовалась 951 инфузия. Для купирования большинства из этих кровотечений (89,5%) было достаточно одной или двух инфузий Когенэйта ФС (средняя доза 28 МЕ/кг). На регулярной основе в этом исследовании было осуществлено 76% инфузий. Девяти больным Когенэйт ФС вводили в связи с 11 случаями хирургических операций. Во всех случаях гемостаз был адекватным.

Согласно данным W. Kreuz и др. [42], при использовании Когенэйта ФС для лечения кровотечений у 61 ранее не лечённого пациента (РНП), а также мало леченных пациентов (МЛП) детского возраста (0,1–25,7 мес) кровотечения эффективно купировались после одной (74%) или двух (15%) инфузий препарата. Клинический ответ после первой инфузии Когенэйта ФС классифицировался как отличный в 58% случаев и как хороший в 33% случаев. Рекомбинантный фактор VIII был использован при 27 хирургических вмешательствах и позволил избежать осложнений в виде кровотечения. Примерно половине из включённых в исследование

пациентов Когенэйт ФС вводили в течение 20 или более дней, и частота появления ингибиторов (15%) была такой же, как и при лечении детей препаратами фактора VIII, полученными из человеческой плазмы. У пациентов с титром ингибиторов менее 10 ЕД (по Бетезду) введение Когенэйта ФС сопровождалось положительным клиническим ответом. При наличии ингибиторов требуется коррекция дозы, которая определяется по степени клинического ответа о количественной оценке концентрации в крови фактора VIII. Частота других побочных эффектов, связанных с введением препарата, составила 0,14% или 1 на 723 инфузии, что подтверждает безопасность лечения Когенэйтом ФС, показанную ранее у взрослых, а также подчёркивает наличие у рекомбинантного фактора VIII исключительно высокого профиля безопасности, проявляющегося в отсутствие сообщений о появлении у людей вирусов гепатита или иммунодефицита со времени начала его клинического использования с конца 1980 гг.

При сравнении эффективности Когенэйта ФС у 65 мальчиков (возраст 6–30 месяцев) с гемофилией А, которые были разделены на 2 группы: в одной группе проводили профилактическую терапию (25 МЕ/кг, через день), а детей другой группы начинали лечить при суставном кровотечении (первоначально 40 МЕ/кг; через 24 и 72 ч — по 20 МЕ/кг), было обнаружно, что частота геморрагий была значительно меньше в группе с профилактическим лечением, чем в группе с лечением возникающих кровотечений (1,5 против 13,7). Согласно данным магнитно-резонансной визуализации (МРВ) патологические изменения в суставах отсутствовали в 93% случаев в первой группе и в 58% — во второй. Костные или хрящевые повреждения были выявлены у 2 мальчиков первой группы и у 13 мальчиков из второй. Важно отметить, что часть суставных кровотечений имела субклинический характер и патология суставов выявлялась у 18% детей только с помощью МРВ.

Совокупность этих результатов и данных об отсутствии у Когенэйта ФС даже малейшего риска наличия вирусных частиц указывает на значительные преимущества применения высокоочищенных генно-инженерных препаратов терапии у детей с различной формой гемофилии по сравнению с использованием ранее полученных препаратов фактора VIII плазменной природы.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 13

1. *Fareed J., Hoppensteadt D.A., Bick R.L.* Management of thrombotic and cardiovascular disorders in the new millennium // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2003. V. 9. P. 101–108.
2. *Fareed J., Hoppensteadt D.A.* The management of thrombotic and cardiovascular disorders in the 21st century // In: New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis. 2nd ed / Ed. A. A. Sasahara, J. Loscalzo. — N. Y.: Marcel Dekker, 2002. P. 687–693.
3. *Eikelboom J. W., Weitz J.I.* A replacement for warfarin: the search continues // Circulation. 2007. V. 116. P. 131–133.
4. *Bates S.M., Weitz J.I.* The status of new anticoagulants // Br. J. Haematol. 2006. V. 134. P. 3–19.
5. *Laux V., Hinder M.* Rationale for direct factor Xa inhibitors in acute coronary syndromes // In: Textbook of International Cardiovascular Pharmacology / Ed. N. Kipshidze, J. Fareed, J. W. Moses, P. W. Serruys. — UK: Informa Healthcare Andover, 2007. P. 119–126.
6. *Leong W., Hoppensteadt D.A.* Generic forms of low molecular weight heparins: some practical considerations // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2003. V. 9. P. 293–297.
7. *Marmur J.D., Anand S.X., Bagga R.S.* The activated clotting time can be used to monitor the low molecular weight heparin dalteparin after intravenous administration // J. Am. Coll. Cardiol. 2003 V. 41. P. 394–402.
8. *Fox K.A.* Implications of the organization to assess strategies for ischemic syndromes-2 (OASIS-2) study and the results in the context of other trials // Am. J. Cardiol. 1999. V. 84. P. 26M–31M.
9. *Lee A. Y., Levine M.N., Baker R.I.* Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer // N. Engl. J. Med. 2003. V. 349. P. 146–153.
10. *Linkins L.A., Weitz J.I.* Pharmacology and clinical potential of direct thrombin inhibitors // Curr. Pharm. Des. 2005. V. 11. P. 3877–3884.
11. *Antman E.M.* Hirudin in acute myocardial infarction. Thrombolysis and thrombin inhibitors in myocardial infarction (TIMI) 9B trial // Circulation. 1996. V. 94. P. 911–921.
12. *Cho L., Bhatt D.L., Marso S.P.* An invasive strategy is associated with decreased mortality in patients with acute coronary syndrome and non-ST elevation myocardial infarction: GUSTO IIb trial // Am. J. Med. 2003. V. 114. P. 106–111.
13. *Eriksson B.I., Ekman S., Lindbratt S.* Prevention of thromboembolism with use of recombinant hirudin: results of a double blind, multicenter trial comparing the efficacy of desirudin (Revasc) with that of unfractionated heparin in patients having a total hip replacement // J. Bone Joint Surg. Am. 1997. V. 79. P. 326–333.
14. *Eriksson B.I., Wille-Jorgensen P., Kalebo P.* A comparison of recombinant hirudin with low-molecular-weight heparin to prevent thromboembolic complications after total hip replacement // N. Engl. J. Med. 1997. V. 337. P. 1329–1335.
15. *Lincoff A.M., Bittl J.A., Harrington R.A.* For the REPLACE-2 Investigators. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb / IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb / IIIa blockade during percutaneous coronary intervention. REPLACE-2 randomized trial // JAMA. 2003. V. 289. P. 853–863.
16. *Stone G. W., McLaurin B. T., Cox D.A.* for the ACUITY investigators. Bivalirudin for patients with acute coronary syndromes // N. Engl. J. Med. 2006. V. 355. P. 2203–2216.
17. *Stone G. W., Bertrand M. E., Moses J. W.* Routine upstream initiation vs. deferred selective use of glycoprotein IIb / IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: the ACUITY Timing trial // JAMA. 2007. V. 297. P. 591–602.

18. *Stone G.W., White H.D., Ohman E.M.* Bivalirudin in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a subgroup analysis from the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage strategy (ACUITY) trial // Lancet. 2007. V. 369. P. 907–919.
19. *Eichler P., Lubenow N., Strobel U., Greinacher A.* Antibodies against lepirudin are polyspecific and recognize epitopes on bivalirudin // Blood. 2004. V. 103. P. 613–616.
20. *Lewis B.E., Wallis D.E., Berkowitz S.D.* Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia // Circulation. 2001. V. 103. P. 1838–1843.
21. *Lewis B.E., Wallis D.E., Leya F.* Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia // Arch. Intern. Med. 2003. V. 163. P. 1849–1856.
22. *Dahl O.E., Eriksson B.I., Agnelli G.* Postoperative melagatran / ximelagatran for the prevention of venous thromboembolism following major elective orthopedic surgery: effects of timing of finishing factors for thromboembolism and bleeding complications on efficacy and safety // Clin. Drug. Investig. 2005. V. 25. P. 65–77.
23. *Kalus J.S., Caron M.F.* Novel uses for current and future direct thrombin inhibitors; focus on ximelagatran and bivalirudin // Expert. Opin. Investig. Drugs. 2004. V. 13. P. 465–477.
24. *Turpie A.G., Fisher W.D., Bauer K.A.* BAY 59–7939: an oral, direct factor Xa inhibitor for the prevention of venous thromboembolism in patients after total knee replacement. A phase II dose-ranging study // J. Thromb. Haemost. 2005. V. 3. P. 2479–2486.
25. *Erikkson B.I., Borris L., Dahl O.* Oral, direct factor Xa inhibition with Bay 59–7939 for the prevention of venous thromboembolism after total hip replacement // J. Thromb. Haemost. 2006. № 4. P. 121–128.
26. *Yusuf S., Mehta S.R., Chrolavicius S.* Effects of fondaparinux on mortality and reinfarction in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the OASIS-6 randomized trial // JAMA. 2006. V. 295. P. 1519–1530.
27. *Saiah E., Soares C.* Small molecule coagulation inhibitors in the clinic // Curr. Trends. Med. Chem. 2005. № 5. P. 1677–1695.
28. *Aherns I., Smith B.K., Bode C., Peter K.* Direct thrombin inhibition with bivalirudin as an antithrombotic strategy in general and interventional cardiology // Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol. 2007. № 3. P. 609–620.
29. *Lewis B.E., Matthai W.H.Jr., Cohen M.* Argatroban anticoagulation during percutaneous coronary intervention in patients with heparin-induced-thrombocytopenia // Catheter Cardiovasc. Interv. 2002. V. 57. P. 177–184.
30. *Alexander J.H., Yang H., Becker R.C.* First experience with direct, selective factor Xa inhibition in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: results of the Xa NADV-ACS trial // J. Thromb. Haemost. 2005. V. 3. P. 439–447.
31. *Cohen M., Bhatt D.L., Alexander J.H.* Randomized, double-blind, dose-ranging study of otamixaban, a novel, parenteral, short-acting direct factor Xa inhibitor, in percutaneous coronary intervention: the SEPIA-PCI trial // Circulation. 2007. V. 115. P. 2642–2651.
32. CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE) // Lancet. 1996. V. 348. P. 1329–1339.
33. *Smith S.C., Feldman T.E., Hirschfeld J.W., Jacobs A.K.* American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on practice guidelines. ACC / AHA / SCA 2005 // Circulation. 2006. V. 113. P. e166–e186.
34. *Bhatt D.L., Bertrand M.E., Berger P.B.* Meta-analysis of randomized and registry comparison of ticlopidine with clopidogrel after stenting // J. Am. Coll. Cardiol. 2002. V. 39. P. 9–14.
35. *Bauer K.A., Eriksson B.I., Lassen M.R., Turpie A.G.* Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after elective major knee surgery // N. Engl. J. Med. 2001. V. 345. P. 1305–1313.
36. *Hirsh J., Guyatt G.H., Albers G.W., Schunemann H.J.* The 7th ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy: evidence-based guidelines // Chest. 2004. V. 126. P. 163S–703S.

37. *Fareed J.* Anticoagulant management of patients undergoing interventional procedures // In: Textbook of International Cardiovascular Pharmacology / Ed. N. Kipshidze, J. Fareed, J. W. Moses, P. W. Serruys. — UK: Informa Healthcare Andover, 2007. P. 613–619.
38. *Flaker G. C., Gruber M., Connolly S. J.* SPORTIF Investigators. Risks and benefits of combining aspirin with anticoagulant therapy in patients with atrial fibrillation: an exploratory analysis of stroke prevention using an oral thrombin inhibitor in atrial fibrillation (SPORTIF) trials // Am. Heart J. 2006. V. 152. P. 967–973.
39. *Peterson P., Grind M., Adler J.* Ximelagatran versus warfarin for stroke prevention in patients with non-valvular atrial fibrillation. SPORTIF II: a dose guiding tolerability and safety study // J. Am. Coll. Cardiol. 2003. V. 41. P. 1445–1451.
40. *Turpie A. G., Lassen M. R., Davidson B. L. et al.* RECORD4 Investigators Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial // Lancet. 2009. V. 373(9676). P. 1673–80.
41. *Якунина Л. Н., Лаврентьева Н. Н., Агеенкова Э. В. и др.* Купирование кровотечений (при наличии ингибитора) у больных с наследственной и приобретённой формами гемофилии (обзор литературы) // Гематология и трансфузиология: Научно-практический журнал. 2003. № 4. С. 40–44.
42. *Kreuz W., Gill J. C., Rothschild C. et al.* Full-length sucrose-formulated recombinant factor VIII for treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe haemophilia A: results of an international clinical investigation // Thromb Haemost. 2005. V. 93, № 3. P. 457–467.

Глава 14

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) обладают обезболивающим (анальгетическим), противовоспалительным (антифлогистическим) и жаропонижающим (антипиретическим) эффектами. Они широко применяются для лечения артритов и болей различной этиологии (в США эти препараты регулярно принимают около 14 млн пациентов). По своей анальгетической эффективности уступают опиоидам. Одним из крупнейших достижений медицины конца XX века стала расшифровка механизмов действия НПВС. Фундаментальный механизм действия НПВС связан с ингибицией циклооксигеназы (ЦОГ), двух её основных изоформ, ЦОГ1 и ЦОГ2, — ключевого фермента метаболизма арахидоновой кислоты, предшественника простагландинов (ПГ). ЦОГ1 — конститутивный фермент слизистой желудка, почек и тромбоцитов, а ЦОГ2 — конститутивный фермент головного мозга, который индуцируется при воспалении, особенно в макрофагах и синовиальной жидкости. Ацетилсалициловая кислота необратимо ингибирует ЦОГ1 и ЦОГ2. Остальные салицилаты ингибирует эти ферменты обратимо. Салицилаты ингибируют образование тромбоцитов и снижают заболеваемость сердца. Побочные эффекты включают повреждение ЖКТ [18].

Прототип всех НПВС — ацетилсалициловая кислота (Аспирин).

Основные группы НПВС следующие:

1) ацетилсалициловая кислота и её производные;
2) производные фенилуксусной кислоты (диклофенак);
3) производные индолуксусной кислоты (индометацин);
4) производнфые пирролизинкарбоксиловой кислоты (кеторолак);
5) производные пропионовой кислоты (ибупрофен);
6) оксикамы (пироксикам).
7) селективные ингибиторы ЦОГ2 (целекоксиб).

Кроме основного ЦОГ-зависимого механизма действия НПВ, главным образом проявляющегося на периферическом (ноцицептивном) уровне и частично на центральном уровне ноцицептивной системы, существует и ЦОГ-независимый механизм действия НПВС, проявляющийся на антиноцицептивной системе (блокада рецепторов возбуждающих аминокислот, изменение конформации G-белка, повышение содержания серотонина, угнетение синтеза нейрокининов, глютамата).

При дегенеративных изменениях позвоночного столба и его суставного аппарата важным становится вопрос о влиянии НПВС на процессы биосинтеза хрящевой ткани. По обобщённым данным в исследованиях *in vitro* было показано, что индометацин и салицилат натрия подавляют синтез компонентов матрикса хряща, а мелоксикам и нимесулид его увеличивают и предотвращают апоптоз хондроцитов. Нейтральное действие демонстрируют диклофенак, пироксикам, ибупрофен.

Выраженность противовоспалительных свойств НПВС коррелирует со степенью ингибирования ЦОГ. Среди них отмечен следующий порядок активности: меклофенамовая кислота, супрофен, индометацин, диклофенак, мефенамовая кислота, флуфенамовая кислота, напроксен, фенилбутазон, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен.

НПВС подавляют преимущественно фазу экссудации. Наиболее мощные препараты — индометацин, диклофенак, фенилбутазон — действуют также на фазу пролиферации (уменьшая синтез коллагена и связанное с этим склерозирование тканей), но слабее, чем на экссудативную фазу. На фазу альтерации НПВС практически не влияют. По противовоспалительной активности НПВС уступают глюкокортикоидам, которые, ингибируя фермент фосфолипазу A_2, тормозят метаболизм фосфолипидов и нарушают образование как простагландинов, так и лейкотриенов, также являющихся важнейшими медиаторами воспаления.

Десенсибилизирующее действие НПВС развивается вследствие:

— уменьшения содержания ПГЕ2 и лейкоцитов в очаге воспаления, что угнетает хемотаксис моноцитов;

— угнетения образования гидрогептанотреновой кислоты, что уменьшает хемотаксис Т-лимфоцитов, эозинофилов и полиморфноядерных лейкоцитов в очаге воспаления;

— торможения бласттрансформации лимфоцитов, для которой необходимы ПГ.

Механизм анальгетического действия складывается из нескольких компонентов, каждый из которых может иметь самостоятельное значение.

Некоторые ПГ (Е2 и F2a) могут повышать чувствительность болевых рецепторов к физическим и химическим стимуляторам, например к действию брадикинина, который в свою очередь способствует высвобождению ПГ из тканей. Таким образом, происходит взаимное усиление альгогенного действия. НПВС, блокируя синтез ПГЕ2 и ПГF2a, в сочетании с прямым антибрадикининовым действием, препятствуют проявлению альгогенного эффекта.

Хотя НПВС на болевые рецепторы не действуют, но, блокируя экссудацию, стабилизируя мембраны лизосом, они опосредованно снижают число чувствительных к химическим раздражителям рецепторов. Определённое значение придаётся влиянию этой группы препаратов на таламические центры болевой чувствительности (локальная блокировка ПГЕ2, F2a в ЦНС), которое приводит к торможению проведения болевых импульсов к коре. Анальгетическая активность диклофенака, индометацина в отношении воспалённых тканей не уступает активности наркотических анальгетиков, в отличие от которых НПВС не влияют на способность ЦНС к суммации подпороговых раздражений.

Анальгезирующий эффект НПВС в большей степени проявляется при болях слабой и средней интенсивности, которые локализуются в мышцах, суставах, сухожилиях, нервных стволах, а также при головной или зубной боли. При сильных висцеральных болях, связанных с травмой, оперативным вмешательством, опухолью, большинство НПВС менее эффективны и уступают по силе анальгезирующего действия наркотическим анальгетикам. В то же время, в ряде контролируемых исследований показана достаточно высокая анальгетическая активность диклофенака, кетеролака, кетопрофена, метамизола при коликах и послеоперационных болях. Эффективность НПВС при почечной колике, возникающей у больных мочекаменной болезнью, во многом связана с торможением продукции ПГЕ2 в почках, снижением почечного кровотока и образования мочи. Это ведёт к уменьшению давления в почечных лоханках и мочеточниках выше места обструкции и обеспечивает длительный анальгезирующий эффект.

Преимуществом НПВС перед наркотическими анальгетиками является то, что они не угнетают дыхательный центр, не вызывают эйфорию и лекарственную зависимость, а при коликах имеет значение ещё и то, что они не обладают спазмогенным действием.

Сравнение селективной анальгезирующей активности по отношению к степени подавления синтеза простагландинов вообще показало, что некоторые НПВС

с сильными анальгетическими свойствами являются слабыми ингибиторами синтеза простагландинов и, наоборот, другие НПВС, способные активно ингибировать синтез простагландинов, обладают слабыми анальгезирующими свойствами. Таким образом, имеет место диссоциация между анальгезирующей и противовоспалительной активностью НПВС. Этот феномен объясняется тем, что анальгетическое действие некоторых НПВС связано не только с подавлением центральных и периферических простагландинов, но и с влиянием на синтез и активность других нейроактивных веществ, играющих ключевую роль в восприятии болевого раздражения в ЦНС.

Центральное противоболевое действие кетопрофена определяется:

— способностью быстро проникать через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) благодаря исключительной жирорастворимости;

— способностью оказывать центральное воздействие на уровне задних столбов спинного мозга путём ингибирования деполяризации нейронов задних столбов;

— способностью селективно блокировать рецепторы возбуждающих аминокислот путём подавления деполяризации ионных каналов, оказывая, таким образом, прямое и быстрое действие на трансмиссию боли. Этот механизм обусловлен способностью кетопрофена стимулировать активность печёночного энзима триптофан-2,3-диоксигеназы, что непосредственным образом отражается на образовании кинуреновой кислоты — антагониста рецепторов возбуждающих аминокислот ЦНС;

— способностью воздействовать на гетеротримерный G-протеин, меняя конфигурацию его α-субъединицы путём её конкурентного замещения в зонах действия; G-протеин, находящийся в постсинаптической мембране, связывается с различными рецепторами, такими как нейрокинины (NK1, NK2, NK3) и рецепторами глутамата, облегчающими прохождение афферентных болевых сигналов через мембрану;

— способностью контролировать уровень некоторых нейротрансмиттеров, таких как серотонин (через влияния на G-протеин и предшественник серотонина 5-гидрокситриптамин), уменьшать выработку субстанции Р.

Сравнительная характеристика анальгезирующего действия наиболее часто используемых в клинике НПВС (Drugs of Choice from the Medical Letter, 1995): кеторолак 30 мг > (кетопрофен 25 мг = ибупрофен 400 мг; флурбипрофен 50 мг) > (ацетилсалициловая кислота 650 мг = парацетамол 650 мг = фенопрофен 200 мг = напроксен 250 мг = этодолак 200 мг = диклофенак 50 мг = мефенамовая кислота 500 мг) > набуметон 1000 мг.

Исходя из приведённых данных можно отметить более высокую анальгезирующую активность дериватов пропионовой кислоты: кетопрофена, ибупрофена, флубипрофена. Наиболее мощный анальгезирующий эффект проявляет кеторолак. Установлено, что 30 мг кеторолака, введённого внутримышечно, эквивалентны 12 мг морфина.

Сущность жаропонижающего действия НПВС сводится к торможению передачи возбуждения в ядрах гипоталамуса, что установлено электрофизиологически и биохимически. Электрофизиологически показано снижение потока импульсов с тепловых рецепторов и, соответственно, снижение «точки отсчёта» этого параметра. Обнаружено выраженное тормозное влияние салицилатов на постсинаптический потенциал в разных отделах мозга. НПВС, ингибируя ПГ в гипоталамусе, уменьшают их влияние на цАМФ и блокируют весь каскад реакций, описанных выше, что приводит к увеличению теплоотдачи и уменьшению теплообразования. Поскольку в поддержании нормальной температуры тела ПГ не участвуют, НПВС не влияют на величину нормальной температуры, чем отличаются от «гипотермических» средств (хлорпромазин и другие). Тормозящее действие НПВС на теплорегуляцию выражается также в снижении выделения клетками гипоталамуса серотонина, адреналина, ацетилхолина. Антипиретическое действие НПВС частично можно объяснить их

ингибирующим влиянием на синтез в фагоцитах, моноцитах и ретикулоцитах эндогенных пирогенов и протеинов с молекулярной массой 10–20 тысяч.

Существует предположение, что жаропонижающее действие некоторых НПВС следует рассматривать как результат конкурентного антагонизма этих лекарственных средств и ПГ на гипоталамические рецепторы. Ряд НПВС (индометацин, бутадион, напроксен, ибупрофен) ингибируют трансформацию лимфоцитов, вызываемую различными антигенами, в связи с чем проявляется их некоторое иммунодепрессивное действие. Вторичное иммунодепрессивное действие определяется также:

— уменьшением капиллярной проницаемости, что затрудняет контакт иммунокомпетентных клеток с антигеном, антител с субстратом;

— стабилизацией лизосомальных мембран в макрофагах, что ограничивает расщепление плохо растворимых антигенов, необходимое для развития следующих этапов иммунной реакции.

В последние годы большой интерес стал проявляться к возможности использования НПВС для профилактики злокачественных опухолей (ЗО) вследствие особенностей их механизмов действия, а также чрезвычайно широкого и часто очень длительного применения.

Современные представления о канцерогенезе как о многофакторном процессе заключаются в ключевом значении метаболической активации экзогенных или эндогенных канцерогенных веществ, приводящей к образованию их аддуктов с ДНК и белками, которые, в свою очередь, приводят к возникновению в клеточных генах точечных мутаций и других повреждений, в результате которых происходят активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров в условиях подавления иммунитета. Поэтому любые химические соединения, снижающие метаболическую активность, в определённой степени могут уменьшать и риск образования ЗО. В то же время любые воздействия, ускоряющие метаболические реакции, например биологические и химические раздражающие провоспалительные вещества, бактериальные, вирусные, паразитарные инфекции и другие факторы, способствуют развитию хронического воспаления и могут привести к канцерогенезу при наличии иммунодепрессии. При воспалении всегда происходит активация метаболизма арахидоновой кислоты по циклооксигеназному и липооксигеназному пути с образованием медиаторов воспаления: простагландинов (ПГ), лейкотриенов, радикалов кислорода. ПГ (в основном ПГЕ2 и ПГI2) являются основными «действующими лицами» в генезе боли, воспаления и повышения температуры, поскольку они являются медиаторами местной воспалительной реакции: вызывают локальное расширение сосудов, отёк, экссудацию, миграцию лейкоцитов. В многочисленных исследованиях показано, что многие опухоли (толстого кишечника, простаты, молочной железы, лёгких) характеризуются более высоким образованием ПГ, чем нормальная ткань [1, 2, 9, 28].

Образование ПГ катализируется циклооксигеназой (ЦОГ), имеющей не менее двух изоферментов: ЦОГ1 и ЦОГ2. ЦОГ1 отвечает за выработку ПГ, участвующих в защите слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), регуляции функций тромбоцитов и почечного кровотока, а второй изофермент ЦОГ2 участвует в синтезе ПГ при воспалении. В здоровых тканях (за исключением головного мозга) ЦОГ2 отсутствует и образуется под действием тканевых факторов (цитокины и др.), запускающих воспалительную реакцию. Первоначально арахидоновая кислота превращается в простагландин ПГН2, который быстро метаболизируется в тромбоксан А2 (ТХА2), и простагландины: ПГI2, ПГD2, ПГF2 и ПГЕ2 (рис. 14.1).

При этом в опухолевых тканях отмечена индукция, в основном, изофермента ЦОГ2, индуцируемого также при воспалении [6, 12, 16, 18, 24, 27]. Наличие у ЦОГ пероксидазной активности может обусловить превращение проканцерогена в канцероген. Например, при участии ЦОГ происходит окисление дигидродиола бензпирена

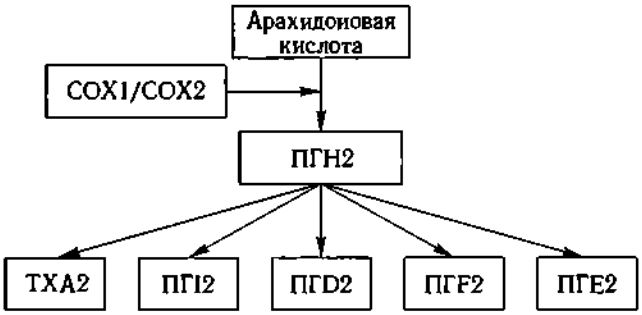


Рис. 14.1. Схеме синтеза простагландинов при участии ЦОГ1/ЦОГ2

с образованием его эпоксидной формы, обладающей способностью ковалентного связывания с ДНК с возникновением мутаций. ЦОГ также может принимать участие в метаболической активации ароматических аминов и катализировать образование их мутагенных метаболитов. Стимуляция ЦОГ сопровождается образованием свободных радикалов, активирующих протоонкогены c-fos, c-myc, c-jun и тем самым стимулирующих пролиферацию и, соответственно, ускоряющих прогрессирование процесса канцерогенеза. Поэтому было логичным предположить, что НПВС, для которых известна способность ингибировать ЦОГ, будут эффективными средствами, подавляющими развитие рака.

Кроме того, противовоспалительное действие НПВС также связано с торможением перекисного окисления липидов, стабилизацией лизосомальных мембран, с торможением процессов образования макроэргических соединений в процессах окислительного фосфорилирования (снижение энергообеспечения воспалительного процесса и торможение хемотаксиса клеток в очаг воспаления), торможением агрегации нейтрофилов (нарушается высвобождение из них медиаторов воспаления), угнетением синтеза рецепторов для факторов роста, взаимодействия лигандов с рецепторами, инактивацией медиаторов воспаления (брадикинин, лимфокины, лейкотриены, факторы комплемента и др.) и торможением пролиферативной фазы воспаления, что также может вносить вклад в подавление канцерогенеза. Исследования показали, что ингибируя ферменты ЦОГ1 и ЦОГ2, НПВС способны увеличить частоту апоптоза (запрограммированную смерть клетки) и предотвратить развитие кровеносных сосудов в опухоли, которые её питают.

Поскольку противовоспалительный и анальгетический эффекты НПВС реализуются за счёт торможения активности ЦОГ2, а некоторые побочные эффекты (гастропатия) появляются при ингибировании ЦОГ1, до определённого времени считалось, что целесообразно использовать в клинической практике избирательные ингибиторы ЦОГ2. Имеющиеся препараты по-разному активны в отношении изоферментов ЦОГ. Так, наиболее активны в отношении ЦОГ1 индометацин, аспирин и пироксикам, несколько менее эффективно на неё действуют напроксен, диклофенак и ибупрофен, более селективны к ЦОГ2 нимесулид, мелоксикам, набуметон и этодолак, наконец, выраженную избирательность проявляют целекоксиб и рофекоксиб.

Активация ЦОГ2 сопровождается стимуляцией ангиогенеза вследствие: 1) выработки сосудистого эндотелиального сосудорасширяющего фактора путём повышения образования транскрипции его информационной РНК; 2) образования $ТХА_2$, $ПГЕ_2$ и простациклина; 3) повышения уровня металлопротеиназ (эндопептидазы, необходимые для опухолевого роста и сосудистой инвазии); 4) ингибирования образования интерлейкина-12 — цитокина с антиангиогенной активностью [12]. Снижение проницаемости капилляров, вызываемое НПВС, можно считать весьма благоприятным

в аспекте подавления процессов метастазирования. В обобщённом виде механизмы антиканцерогенного действия ингибиторов ЦОГ представлены в табл. 14.1.

Таблица 14.1

Механизмы предотвращения развития рака при ингибировании ЦОГ

Механизм	Медиаторы, ферменты, принимающие участие в реализации эффекта
Подавление ангиогенеза	ПГЕ2, фактор роста клеток эндотелия
Подавление пролиферации	ПГЕ2, подавляющие клеточную пролиферацию
Антиоксидантное действие	Пероксидаза, цитохром Р-450, свободные радикалы, активирующие канцерогенез
Апоптоз	Ингибирование образования активаторов рецепторов пролиферации пероксисома
Проницаемость сосудистой стенки	ПГЕ2, снижение проницаемости эндотелия

Имеются экспериментальные подтверждения протекторной роли НПВС в отношении развития злокачественных образований (ЗО). G.M. Sclabas и др. [21] показали, что при инокуляции мышам культуры карциномы поджелудочной железы во всех случаях развивается рак поджелудочной железы. В то же время у мышей, которым до этого вводили аспирин в течение 6 дней или его введение начинали в тот же день, когда инъецировали опухолевые клетки, частота развития опухоли поджелудочной железы значительно уменьшалась (на 73% и 60% соответственно). При этом введение аспирина через 2 недели после инъекции опухолевых клеток было практически неэффективным, хотя и в этом случае частота развития опухоли уменьшилась на 27%, но эта величина статистически достоверно не отличалась от контроля. Можно полагать, что механизм этого эффекта аспирина связан с ингибированием транскрипционного ядерного фактора NF-$\varkappa$B, выявленным при культивировании данных опухолевых клеток с аспирином *in vitro*. Как известно, при воспалении индуцируется ЦОГ2 и повышается активность NF-$\varkappa$B.

Проведение достаточно большого числа эпидемиологических исследований (около 100) также позволило найти доказательства наличия у НПВС способности оказывать профилактическое действие в отношении развития ЗО [3, 8, 11, 19, 20, 22]. В частности, получены данные, которые свидетельствуют об экспоненциальном снижении риска развития рака (в том числе рака толстой кишки, молочной железы, лёгких и простаты) в зависимости от дозы НПВС (в большинстве случаев больные принимали аспирин или ибупрофен) при их длительном (не менее 5 лет) применении [10]. Ежедневный приём НПВС вызвал снижение риска образования рака толстой кишки (63%), молочной железы (39%), лёгких (36%), простаты (39%), пищевода (73%), желудка (62%) и яичников (47%). Статистически достоверным этот эффект НПВС становится лишь через 5 лет их приёма, и чем длительнее их приём, тем выраженней защитный эффект.

Несмотря на то что имеются многочисленные работы, свидетельствующие о снижении риска развития ЗО при приёме НПВС, только для препарата целекоксиба имеется зарегистрированное в FDA показание для его клинического применения с целью лечения гиперплазии — предракового заболевания семейного аденоматозного полипоза. Это показание зарегистрировано на основании клинических данных о том, что ежедневный приём целекоксиба (400 мг) в течение 6 месяцев приводит к снижению числа колоректальных полипов на 28%. В дозе 100 мг целекоксиб был менее эффективен: число полипов снижалось на 12%.

Вопрос об утверждении аналогичных показаний для других НПВС остаётся открытым, хотя исследования в этой области продолжаются. Недавно проведённые рандомизированные исследования в отношении приёма аспирина и других неизбирательных НПВС показали их защитное влияние на риск развития рака толстой и прямой кишок [5]. Выраженный защитный эффект (относительный риск 0,47) наблюдался при дозе более 14 таблеток (325 мг) аспирина в неделю, которая значительно выше, чем та, которая рекомендуется для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. При этом статистическая достоверность защитного действия аспирина имела место при его приёме в течение 20 лет, а 10-летний приём был неэффективен. Однако, к сожалению, частота побочных эффектов аспирина (гастропатия, кровотечения и др.) также дозозависимы. Иными словами, повышение продолжительности приёма и дозы аспирина приводит как к повышению антиканцерогенного действия, так и побочных эффектов, среди которых наиболее важное значение имеет их ульцерогенный эффект.

Побочные эффекты аспирина и других неизбирательных ингибиторов ЦОГ встречаются достаточно часто, так как эта группа ЛС чаще других применяется без контроля врача, а также ввиду широты показаний и длительности применения. Механизм многих побочных эффектов тот же, что и лечебного действия. Частота развития их зависит, прежде всего, от суточной дозы, а также от длительности применения. Раздражающее действие на ЖКТ — основное отрицательное свойство неизбирательных ингибиторов ЦОГ (10–35% всех побочных эффектов), объясняется снижением цитопротективного действия ПГ на слизистую ЖКТ, что ведёт к увеличению кислотности желудочного сока, повышению проницаемости клеточной мембраны, снижению синтеза гликопротеинов, защитной слизи и бикарбонатов. Оно может проявляться диспептическими расстройствами (болями, тяжестью в эпигастрии, тошнотой, рвотой, вздутием живота, изжогой, снижением аппетита, поносом или запором — у 30–40% больных), образованием эрозий, язв в желудке и двенадцатиперстной кишке (у 10–20% больных), вплоть до желудочно-кишечных кровотечений и перфораций (у 2–5% больных). Язвы также могут вызываться прижигающим действием плохо распадающихся таблеток аспирина.

Наиболее ульцерогенны, кроме аспирина, индометацин и пироксикам. Симптоматика при поражении ЖКТ у половины больных отсутствует (особенно пожилых), выявляется часто случайно (возможно, связано с анальгетическим действием препаратов). Повышенный риск гастротоксичности имеют: пожилые пациенты (более 60 лет), курящие, злоупотребляющие алкоголем, имеющие семейный язвенный анамнез, женщины, лица с тяжёлыми сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также при совместном приёме глюкокортикоидов, антикоагулянтов. Естественно, риск увеличен также при длительной терапии НПВС, больших дозах или приёме двух или более препаратов этой группы.

В отличие от неизбирательных ингибиторов ЦОГ, селективные ингибиторы ЦОГ2 лишены выраженных ульцерогенных эффектов. Многие авторы рекомендовали длительное использование именно этих препаратов для профилактики развития ЗО [1, 2, 9, 13, 16, 20, 24, 26, 28]. Однако у селективных ингибиторов ЦОГ2 была выявлена возможность возникновения другого типа побочных эффектов — повышение частоты развития тромбогенных заболеваний, в частности инфаркта миокарда [4, 7, 15, 17, 23]. Поэтому безопасность приёма селективных ингибиторов ЦОГ2 при длительном применении ещё нуждается в доказательствах.

Следует подчеркнуть, что данные о профилактическом действии НПВС в основном были получены в результате проведения ретроспективных эпидемиологических исследований, основанных на опросе пациентов о приёме ими НПВС. В лучшем случае группы пациентов разделяли рандомизированным образом на ту, где применялись НПВС, и на ту, где они не применялись. При этом не учитывали, при каких

заболеваниях длительно применялись НПВС. Например, в случае ревматического артрита само заболевание так изменяет функционирование иммунной системы, что уменьшается риск развития ЗО. Кроме того, самим НПВС присущ имуносупрессивный эффект, обусловленный локальной иммуносупрессией простагландинами, которые снижают активность лимфоцитов и клеток-киллеров, а также ингибированием α-фактора некроза опухолей. Вклад в иммуносупрессию при длительном применении НПВС могут вносить снижение проницаемости капилляров и затруднение контакта иммунокомпетентных клеток и антител с антигеном.

С нашей точки зрения, более доказательными следует считать результаты рандомизированных плацебо-контролируемых исследований. К таким можно отнести работу N. R. Cook и др. [6], в которой сравнили эффект приёма аспирина (100 мг) или плацебо через день у 39876 женщин в течение 10,1 года. При этом влияния аспирина на общее число раковых заболеваний, а также на рак молочной железы, толстого кишечника или другой локализации не обнаружено, за исключением тенденции к снижению частоты возникновения рака лёгких (относительный риск 0,78). Эти данные не исключают защитной роли больших доз аспирина или других НПВС, однако указывают на необходимость более осторожного отношения к выводам о профилактической значимости НПВС, полученных при проведении исследований, основанных на опросе пациентов, которые не являются плацебо-контролируемыми. Тем более, что и некоторые эпидемиологические неконтролируемые исследования также не продемонстрировали защитных противораковых эффектов НПВС. В качестве примера можно привести данные S. Marshall и др. [14], полученные путём опроса 114 460 женщин, у которых рак молочной железы с 1995 г. по 2001 г. возник в 2391 случае. Оказалось, что только длительный (более 5 лет) ежедневный приём аспирина привёл к некоторому снижению частоты развития рака молочной железы (относительный риск 0,80), которое было статистически недостоверным и касалось только раков положительных в отношении наличия эстрогенных и гестагенных рецепторов. Более того, приём аспирина сопровождался значительным ростом возникновения рака молочной железы (относительный риск 1,81), в клетках которого отсутствовали рецепторы для эстрогенов и гестагенов. По данным этих авторов, длительный приём ибупрофена сопровождался увеличением риска возникновения рака молочной железы (относительный риск 1,51). Важно подчеркнуть, что защитный эффект НПВС зависит как от частоты и продолжительности их использования, так и от рецепторного статуса клеток рака молочной железы [25].

Таким образом, несмотря на появление ряда обнадёживающих результатов в профилактике развития ЗО с помощью НПВС, вопрос о целесообразности их приёма для снижения риска развития ЗО остаётся во многом дискуссионным. Пока ещё нет достаточных оснований для утверждения показаний применения НПВС для профилактики и лечения онкологических заболеваний, не определены дозы, которые бы были эффективны при сохранении безопасности. С нашей точки зрения основные трудности в решении этого вопроса связаны не только с тем, что непросто проводить длительные плацебо-контролируемые рандомизированные исследования, но и с тем, что слишком многие причины могут приводить к канцерогенезу, и все их вряд ли можно устранить с помощью какого-либо одного способа фармакотерапии. Лишь прогресс в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза может помочь обосновать пути направленного поиска предотвращения развития ЗО. Существующее направление такого поиска среди НПВС носит во многом эмпирический характер, и пока нельзя сделать однозначные выводы о наличии у них доказанной профилактической или лечебной эффективности при ЗО, которые имеют клиническую значимость для всех пациентов.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 14

1. *Altorki N.K., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J.* COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract tumors // Semin. Oncol. 2004. V. 31. P. 30–35.
2. *Arun B., Goss P.* The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention // Semin. Oncol. 2004. V. 31. P. 22–29.
3. *Baron J.A., Cole B., Sandler F.R.S. et al.* A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas // N. Engl. J. Med. 2003. V. 348. P. 891–899.
4. *Bresalier R.S., Sandler R.S., Quan H. et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. P. 1092–102.
5. *Chan A.T., Giovannucci E.L., Meyerhardt J.A.* Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer // JAMA. 2005. V. 294. P. 914–923.
6. *Cook N.R., Lee I.M., Gaziano J.M. et al.* Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled tria // JAMA. 2005. V. 294. P. 47–55.
7. *FitzGerald G.A.* Coxibs and cardiovascular disease // N. Engl. J. Med. 2004. V. 351. P. 1709–1711.
8. *Garcia-Rodriguez L.A., Gonzalez-Perez A.* Risk of breast cancer among users of aspirin and other anti-inflammatory drugs // Br. J. Cancer. 2004. V. 91. P. 525–529.
9. *Gately S., Li W.W.* Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy // Semin. Oncol. 2004. V. 31. P. 2–11.
10. *Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.* The biology of VEGF and its receptors // Nat. Med. 2003. V. 9. P. 669–676.
11. *Harris R.E., Beebe-Donk J., Doss H.* Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review) // Oncol. Rep. 2005. V. 13. P. 559–583.
12. *Jacobs E.J., Rodriguez C., Mondul A.M.* A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence // J. Natl. Cancer Inst. 2005. V. 97. P. 975–980.
13. *Leahy K.M., Ornberg R.L., Wang Y., Zweifel B.S., Koki A.T., Masferrer J.L.* Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 625–631.
14. *Liu C.H., Chang S.H., Narko K. et al.* Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice // J. Biol. Chem. 2001. V. 277. P. 18563–1869.
15. *Marshall S.F., Bernstein L., Anton-Culver H.* Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk by stage and hormone receptor status // J. Natl. Cancer Inst. 2005. V. 97. P. 805–812.
16. *Nussmeier N.A., Whelton A.A., Brown M.T. et al.* Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. P. 1081–1091.
17. *Petkova D.K., Clelland C., Ronan J. et al.* Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer // Respir. Med. 2004. V. 98. P. 164–172.
18. *Platz E.A., Rohrmann S., Pearson J.D.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of prostate cancer in the Baltimore Longitudinal Study of Aging // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005. V. 14. P. 390–396.
19. *Rao P., Knaus E.E.* Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond // J. Pharm. Pharm. Sci. 2008. V. 20, № 11(2). P. 81s–110s.
20. *Sandler A.B., Dubinet S.M.* COX-2 inhibition and lung cancer // Semin. Oncol. 2004. V. 31. P. 45–52.

21. *Schernhammer E.S., Kang J.H., Chan A.T. et al.* A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women // J. Natl. Cancer Inst. 2004. V. 96. P. 22–28.
22. *Sclabas G.M., Uwagawa T., Schmidt C. et al.* Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin // Cancer. 2005. V. 103. P. 2485–2490.
23. *Sivak-Sears N.R., Schwartzbaum J.A., Miike R., Moghadassi M., Wrensch M.* Case-control study of use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and glioblastoma multiforme // Am. J. Epidemiol. 2004. V. 159. P. 1131–1139.
24. *Solomon S.D., McMurrAy J.J., Pfeffer M.A. et al.* Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. P. 1071–1080.
25. *Stolina M., Sharma S., Lin Y. et al.* Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 361–370.
26. *Terry M.B., Gammon M.D., Zhang F.F. et al.* Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk // JAMA. 2004. V. 291. P. 2433–2440.
27. *Wei D., Wang L., He Y.* Celecoxib inhibits vascular endothelia growth factor expression by targeting Sp1 transcription factor and reduces human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003. V. 44. P. 633.
28. *Wiese F.W., Thompson P.A., Kadlubar F.F.* Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2 // Carcinogenesis. 2001. V. 21. P. 5–10.
29. *Yuan A., Pan-Chyr Y., Kwen-Tay L.* Tumoral COX-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis, and associated with short survival and early relapse in non small cell lung cancer // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003. V. 44. P. 928.

Глава 15

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ КОНТРАСТНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

В настоящее время для диагностики различных заболеваний внутренних органов используют рентгеновские лучи, γ-излучение, явление магнитного резонанса, ультразвук и лазерное излучение.

По характеру получаемой с их помощью информации современные диагностические средства (ДС) можно разделить на препараты для функциональной диагностики и препараты, позволяющие визуализировать (контрастировать) отдельные органы или патологические очаги. Классификация диагностических средств в зависимости от типа индикации и строения субстанций приведена в табл. 15.1 [1–16].

Таблица 15.1

Классификация контрастно-диагностических средств по типу индикации и классы химических соединений, к которым принадлежат действующие субстанции

Тип индикации (класс препаратов)	Отличительные признаки	
	Характерный атом	Класс соединений
Поглощение рентгеновского излучения (рентгеноконтрастные средства)	Тяжёлые атомы — йод, барий	Органические йодсодержащие соединения, неорганические соединения бария
Изменение магнитных параметров ядер элементов, входящих в состав структур организма (магнитно-резонансные контрастные средства)	Парамагнитные атомы (Gd, Mn, Fe), изменяющие магнитные параметры ядер водорода	Комплексные соединения гадолиния, марганца, суперпарамагнитные частицы оксида железа
Изменение отражательной способности тканей по отношению к ультразвуку (ультразвуковые контрастные средства)	Микропузырьки воздуха	Галактоза и другие частицы, способствующие образованию микропузырьков газа
Испускание γ-квантов (радиофармацевтические средства)	Радионуклид-γ-излучатель	Органические соединения, биополимеры, комплексные соединения с радиоактивным изотопом металла
Поглощение и испускание видимого света — лазерная томография (флуоресцентные контрастные средства)	Молекула, способная поглощать и испускать электромагнитное излучение в видимой области спектра	Органические полициклические соединения, используемые в микромолярных концентрациях (на стадии разработки)

15.1. Рентгеноконтрастные средства

Рентгеноконтрастные средства (РКС) разделяют на препараты, пропускающие рентгеновские лучи (рентгенонегативные) и задерживающие их (рентгенопозитивные). К первой группе были отнесены двуокись углерода, азот, кислород и другие газы. Ко второй группе — вещества, содержащие йод, барий и другие элементы, поглощающие рентгеновские лучи [6].

За всю историю развития РКС в качестве контрастных атомов были изучены многие химические элементы, в частности висмут, барий, тантал, стронций, йод, бром, фтор. Из них оптимальными оказались соединения йода и бария. Начиная с 1950-х гг. органические йодсодержащие РКС широко используются для целей ангиографии, урографии, холецистографии, лимфографии и других разновидностей этих методов.

После появления в 1950-х гг. прошлого века трийодированных производных бензойной кислоты эти органические соединения стали основой многих РКС, которые доминируют в лучевой диагностике, и в ближайшем будущем маловероятно появление конкурирующих веществ по следующим основным причинам.

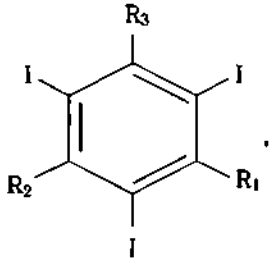
1. Йод — единственный химический элемент, которому присущи три важных свойства, необходимых для контрастно-диагностического средства: способность сильно поглощать рентгеновские лучи; способность образовывать стабильные соединения с органическими структурами, не метаболизирующимися в живых организмах и не вызывающими значительных токсических реакций при введении в диагностических дозах.

2. В ароматических структурах на основе трийодбензоата содержание йода достигает 84%, позволяя получать высококонтрастные средства.

3. Положения 1, 3, 5 бензольного кольца доступны для химической модификации, позволяя создавать средства с оптимальными биологическими свойствами, хорошей переносимостью и органотропностью.

Наибольшее распространение в настоящее время имеют трийодзамещенные ароматические РКС. Йод, поглощающий рентгеновские лучи, определяет контрастные свойства препаратов. Вся остальная часть молекулы выполняет функцию носителя йода, определяя стабильность, токсичность, растворимость и органоспецифичность РКС. Высокая стабильность РКС как при хранении, так и после введения в организм осуществляется за счёт присоединения атомов йода к ароматическим ядрам, водорастворимость обеспечивается гидрофильными полярными группировками. К гидрофильным группам, способным активно взаимодействовать с водой, можно отнести полярные группы (частично заряженные) — амидные, кислотные, гидроксильные и т. д.

Структурную формулу большинства современных РКС можно представить схемой



на которой R — это заместители, во многом определяющие растворимость, органотропность и токсичность; I — атомы йода, которые обусловливают рентгеноконтрастность. В качестве заместителей у трийодзамещенного бензольного кольца

(ТБК) (R_1, R_2 и R_3) используются различные химические группы. R_1 у ионных РКС чаще всего представляет собой углеводородную цепочку с кислотной группой или просто кислотную группу, у неионных обычно вместо кислотной группы включается какой-либо сахар или углеводородная цепочка с гидроксильными группами: R_2, R_3 — органические радикалы, придающие веществу бóльшую или меньшую растворимость в воде. Наличие или отсутствие радикалов в положении R_3 определяет органотропность РКС: замена атома водорода на органический радикал превращает холецистохолангиографическое РКС в ангиоурографическое.

Замена карбоксильной группы в мономерных РКС на радикал, содержащий гидроксильные группы, сопровождается снижением осмоляльности раствора РКС в несколько раз, без значительного изменения вязкости, что приводит к уменьшению нейротоксичности, кардиотоксичности, нефротоксичности и хемотоксичности препарата.

Таким образом, современные органические йодсодержащие РКС — это ионные (соль натрия и метилглюкаминовая соль) или неионные (растворимость осуществляется за счёт включения в структуру гидроксильных групп) вещества, синтезированные на основе ТБК, различия между которыми заключаются в разном соотношении гидрофильных и гидрофобных групп боковых цепей в первом, третьем и пятом положениях ТБК.

После появления неионных препаратов положение резко изменилось. Обширные клинические испытания, проведённые в разных странах, неопровержимо доказали превосходство неионных контрастных средств перед ионными как в отношении их лучшей переносимости, так и безболезненности для пациента. Это определяется в первую очередь следующими свойствами, характерными для неионных контрастных препаратов: низкой осмотичности (отсутствие нагрузки ионами) и, как следствие этого, уменьшенной химической токсичности.

Число лекарственных форм трийодзамещенных ароматических контрастных средств достигает тысячи наименований, но химических соединений, лежащих в их основе, на два порядка меньше. Возможна следующая химическая классификация.

1. *Ионные трийодзамещенные РКС.*
   1.1. Мономерные ароматические соединения.
      1.1.1. Производные трийодсодержащих алкановых кислот.
      1.1.2. Производные трийодбензойной кислоты.
   1.2. Димерные ароматические соединения.
      1.2.1. Ацетамидометилкарбамоил-производные трийодбензойной кислоты.
      1.2.2. Полиметиленовые димеры трийодбензойной кислоты.

В качестве катионов всех перечисленных ионных РКС, используемых в виде солей, применяют Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} и метилглюкаммоний$^+$.

2. *Неионные трийодсодержащие РКС.*
   2.1. Мономерные ароматические соединения.
   2.2. Димерные ароматические соединения.

РКС на основе алифатических йодосодержащих соединений (монойодстеараты, дийодстеараты и йодированные растительные масла) не получили широкого распространения в отличие от циклических РКС.

В качестве РКС в настоящее время используют сульфат бария для контрастирования желудочно-кишечного тракта и водорастворимые препараты для диагностики заболеваний сосудистой системы, полостей тела и внутренних органов.

Сульфат бария используют в виде нерастворимой сульфатной соли, которая не всасывается из желудочно-кишечного тракта. Сульфат бария предлагается в виде порошка, и из него получают суспензию непосредственно перед применением. При двойном контрастировании полость заполняется газом и стенка кишечника покры-

вается сульфатом бария. Обычно концентрация сульфата бария составляет около 1 г/мл или меньше при проведении рутинных исследований желудочно-кишечного тракта. В отдельных случаях при использовании метода двойного контрастирования используют высококонцентрированные препараты с концентрацией 2,5 г/мл. Препараты сульфата бария нельзя использовать при подозрении на перфорацию, так как при попадании в брюшную полость сульфат бария не элиминируется. В этом случае можно использовать водорастворимые йодсодержащие РКС (Урографин-76%, Гастрографин, Ультр вист-370, Изовист-300).

15.1.1. Водорастворимые контрастные средства для внутрисосудистого и внутриполостного введения. Области применения этих РКС достаточно широки, включая как простое механическое контрастирование полостей или сосудов, которые они заполняют, так и оценку элиминирующей способности печени и почек

Ионные контрастные средства для внутривенной холангиохолецистографии. Эта группа РКС характеризуется высоким сродством к белкам плазмы, главным образом к сывороточному альбумину. Белковое связывание предотвращает быстрое выведение йодсодержащей молекулы почками, но обеспечивает его накопление гепатоцитами. Экскретируясь по аналогии с желчными кислотами и конъюгированным билирубином в желчь, холеграфические РКС контрастируют желчевыделительную систему. РКС для внутривенной холеграфии представляют собой димеры трийодированных ароматических структур. Первый препарат этого ряда йодипамид (Билиграфин, Билигност), не имея заместителей в 5-м положении бензольного кольца, прочно связывается с альбумином, не подвергается метаболизму и обратному всасыванию в желудочно-кишечном тракте, но часто вызывает побочные реакции. Позднее были созданы холеграфические РКС с меньшим сродством к альбумину, что ускоряет их выведение с желчью и уменьшает потенциальную способность вызывать побочные реакции. Современный препарат для внутривенной холеграфии Билископин характеризуется хорошей переносимостью, особенно в случае его введения путём инфузии с помощью автоматической инжекторной системы.

Если РКС для внутривенной холангиохолецистографии применяются достаточно часто при проведении компьютерной томографии, давая возможность визуализировать желчевыделительную систему наилучшим образом (получение трёхмерного изображения), то РКС для оральной холеграфии в последнее время используют очень редко вследствие развития альтернативных методов лучевой диагностики — ультразвуковой, КТ, МРТ, которые переносятся лучше, позволяя получать необходимую диагностическую информацию. Информацию о свойствах РКС для пероральной холеграфии можно найти в наших предыдущих работах. В основном они представляют лишь исторический интерес и как РКС в настоящее время практически не применяются.

Ионные контрастные средства для уро/ангиографии и визуализации полостей тела. В настоящее время во многих странах препараты этой группы продолжают использоваться из-за экономических проблем, хотя их доля в мире в целом из года в год уменьшается за счёт увеличения доли использования неионных РКС.

Международные непатентованные и торгове названия основных современных РКС представлены в табл. 15.2.

Родоначальник ионных мономерных трийодбензоатов с заместителями в 3-м и 5-м положениях бензольного кольца Урографин из этой группы препаратов по эффективности (диагностической ценности), переносимости и стоимости остаётся непревзойдённым РКС. Вместе с тем количество его аналогов на рынке в России

Таблица 15.2

Современные йодсодержащие рентгеноконтрастные средства

Тип РКС	Международные непатентованые названия РКС	Торговые названия	Отношение количества атомов йода к числу частиц в растворах РКС	Отношение осмолярности растворов РКС к осмолярности крови
Ионные мономеры	Амидотризоат	Урографин (Триомбраст, Тразограф)	3 : 2	5
	Йодамид	Йодамид		
	Иокситаламат	Телебрикс		
Ионные димеры (низкоосмотичные ионные РКС)	Иоксаглат	Гексабрикс	3 : 1	2
Неионные мономеры (низкоосмотичные неионные РКС)	Йопромид	Ультравист	3 : 1	2
	Йогексол	Омнипак		
	Йопамидол	Йопамиро		
	Йобитридол	Ксенетикс		
	Йоверсол	Оптирей		
	Йоксилан	Оксилан		
Неионные димеры (изоосмотичные РКС)	Йотролан	Изовист	6 : 1	1
	Йодиксанол	Визипак		

увеличивается, что требует знания их характеристик для обоснования выбора рентгенологами Урографина (табл. 15.3).

Начиная с 1954 г., когда была синтезирована амидотризоевая кислота, учёные стараются найти наилучший катионный солевой компонент для обеспечения оптимальной растворимости, наименьшей вязкости и высокой безопасности. Среди таких компонентов испытывали натрий, меглюмин или их смесь, а также лизин. Сразу отметим, что характер катиона заметно влияет на растворимость, вязкость, осмотичность препарата и, соответственно, на его фармакокинетику и фармакодинамику. Поэтому препараты амидотризоата даже с одинаковым содержанием йода, но с разным типом катиона имеют различную растворимость, неодинаковую биологическую активность и их нельзя заменять один на другой (Contrast media in practice / Ed. P. Dawson, W. Claus. — Springer-Verlag, 1993). Известно, что замена натрия на меглюмин повышает растворимость амидотризоата, но увеличивает его вязкость и диуретический эффект при снижении способности контрастировать мочевыделительную систему (табл. 15.4).

Таким образом, оптимальным оказалось использовать смесь натриевой и меглюминовой солей.

Водные растворы амидотризоата натрия и меглюкамина содержат смеси натриевой и метилглюкаминовой солей амидотризоата. В 1 мл 76 %-го раствора содержится 0,1 г натриевой и 0,66 г метилглюкаминовой соли, что соответствует 370 мг йода; в 1 мл

Таблица 15.3

Некоторые свойства Урографина и его аналогов

Торговое название (концентрация йода, мг/мл)	Фирма — производитель лекарственной формы	Производитель активной субстанции	Состав (содержание компонентов в 1 мл)	Срок годности
Урографин 60% (292)	Шеринг АГ	Шеринг АГ	0,08 г амидотризоата натрия 0,52 г амидотризоата меглюмина	5 лет
Урографин 76% (370)	Шеринг АГ	Шеринг АГ	0,10 г амидотризоата натрия 0,66 г амидотризоата меглюмина	5 лет
Гипак 60% (282)	Эббот Лэбораториз (США) для Никомед Амершам Имейджинг**	Juste Imagen S. A., Spain	0,6 г диатризоата меглюмина	3 года
Гипак 76% (370)	Эббот Лэбораториз (США) для Никомед Амершам Имейджинг	Juste Imagen S. A., Spain	0,1 г диатризоата натрия 0,66 г диатризоата меглюмина	
Триомбраст 60% (292)	Фармак	Фармак	0,08 г амидотризоата натрия 0,52 г амидотризоата меглюмина	3 года
Триомбраст 76% (370)	Фармак	Фармак	0,10 г амидотризоата натрия 0,66 г амидотризоата меглюмина	3 года
Тразограф 60% (282)	Unique Pharmaceutical Laboratories (Индия)	Juste Imagen S. A., Spain	0,6 г диатризоата меглюмина	5 лет
Тразограф 76% (370)	Unique Pharmaceutical Laboratories (Индия)	Juste Imagen S. A., Spain	0,1 г диатризоата натрия 0,66 г диатризоата меглюмина	5 лет

* Диатризоат — синоним амидотризоата; ** ныне Амершам Хэлс (Amersham Health).

60%-го раствора содержится 0,08 г натриевой и 0,52 г метилглюкаминовой соли, что соответствует 292 мг йода.

РКС на основе амидотризоата показаны для внутривенной урографии, ретроградной пиелографии, ангиографии, артрографии, интраоперационной холангиографии, фистулографии, гистеросальпингографии, спленопортографии, везикулографии и др.

Противопоказаниями для солей амидотризоата являются выраженный гипертиреоз, сердечная недостаточность, печёночная и/или почечная недостаточноять, коллапс, шок, туберкулёз (активная форма). Гистеросальпингографию с использованием

Таблица 15.4

Преимущества и недостатки натриевой и меглюминовых солей РКС

Меглюминовая соль	Натриевая соль
Лучше растворимость	Растворимость с некоторыми кислотами низкая
Выше вязкость	Ниже вязкость
Лучше общая переносимость	Чаще вызывает тошноту и рвоту
Реже вызывает сосудистые эффекты	Нарушает структуру гематоэнцефалического барьера
Сильнее повышает диурез	Слабее вызывает диурез
Слабее контрастирует мочевыделительную систему	Лучше контрастирует мочевыделительную систему
—	Уменьшает выход из клеток K^+

препарата не проводят при беременности и острых воспалительных заболеваниях органов малого таза. Ввиду возможного возникновения нейротоксических явлений применение амидотризоата запрещено при миелографии, вентрикулографии и цистернографии.

Внутрисосудистое введение амидотризоата иногда сопровождается тошнотой, рвотой, головокружением, покраснением кожи, цианозом, чувством жара. Эти реакции обычно быстро исчезают при уменьшении скорости введения препарата или прекращении его введения. При введении препарата в редких случаях (обычно у пациентов с отягощённым аллергологическим анамнезом) возникают озноб, лихорадка, потоотделение, головная боль, побледнение, рвота, слабость и чувство удушья, затруднение дыхания, подъём или падение АД, зуд, крапивница и другие кожные проявления, отёк Квинке, тремор, чиханье, слезотечение. Эти реакции развиваются независимо от количества введённого препарата и могут быть первыми признаками анафилактического шока и судороги. В этом случае введение РКС следует немедленно прекратить и принять экстренные меры для купирования возникших реакций. Тяжёлые побочные эффекты, требующие экстренной терапии, могут возникать в виде сосудистых реакций (например, периферической вазодилатации с последующей артериальной гипотензией и рефлекторной тахикардией), одышки, спутанности или потери сознания. Околососудистое введение РКС иногда приводит к тяжёлым тканевым реакциям. При проведении церебральной ангиографии или других процедур, при которых РКС с артериальной кровью достигает головного мозга, могут развиваться такие неврологические осложнения, как кома, преходящая спутанность сознания и сонливость, транзиторные парезы, нарушения зрения, а у больных эпилепсией — судорожные припадки (крайне редко приступы у таких больных могут возникать и при внутривенном введении РКС). Весьма редко наблюдают преходящую острую почечную недостаточность. Иногда возможны и отсроченные реакции.

При применении йодсодержащих РКС у пациентов с отягощённым аллергологическим анамнезом необходима особая осторожность. В этих случаях может быть проведена лекарственная подготовка с использованием глюкокортикоидов и/или антигистаминных препаратов (однако РКС и препараты для профилактики нельзя смешивать и вводить одновременно). У пациентов с феохромоцитомой в связи с опасностью развития гипертензивного криза рекомендуют предварительное введение α-адреноблокаторов (например, внутривенно 5 мг фентоламина). Особого внимания

требуют больные с дисфункцией печени и/или почек, латентным гипертиреозом, миеломной болезнью, сахарным диабетом, дети грудного и младшего возраста, а также пожилые пациенты, которым нельзя ограничивать приём жидкости перед исследованием, а дефицит воды и электролитов должен быть полностью компенсирован.

Йодсодержащие РКС могут препятствовать проведению исследования функции щитовидной железы. В связи с этим следует учитывать, что в течение по крайней мере 2 недель после использования амидотризоата поглощение радионуклидов, предназначенных для диагностики дисфункции щитовидной железы, уменьшено. Наличие диабетической нефропатии может увеличить риск нарушений функции почек при внутрисосудистом введении РКС и привести к развитию лактат-ацидоза у пациентов, принимающих бигуаниды. Для предупреждения этого приём бигуанидов следует прекратить за 48 ч до рентгенологического исследования с применением амидотризоата. Реакции гиперчувствительности могут быть усилены у пациентов, принимающих β-адреноблокаторы. Вероятность развития отсроченных реакций на РКС (таких как лихорадка, сыпь, гриппоподобные симптомы, боли в суставах и зуд) выше у пациентов, которым назначены препараты интерлейкинов.

Для улучшения результатов исследования при урографии и ангиографии органов брюшной полости рекомендуется предварительное очищение кишечника. Нагревание РКС до температуры тела способствует его лучшей переносимости.

Внутривенная урография. Используют 60%-е и 76%-е растворы препарата. Обычная скорость инъекции составляет 20 мл/мин. Доза для взрослых и детей старшего возраста составляет до 1,5 мл/кг 60%-го раствора (максимально 150 мл) и до 1 мл/кг 76%-го раствора (максимальная доза 100 мл). Детям младшего возраста из-за физиологически низкой концентрационной способности почек необходимы относительно высокие дозы амидотризоата 76%-й концентрации (табл. 15.5).

Таблица 15.5

Возрастная доза 76%-го раствора амидотризоата

Возраст, годы	Дозы, мл
До 1	7–10
1–2	10–12
2–6	12–15
6–12	15–20
Старше 12	Доза для взрослых

При проведении ангиокардиографических исследований предпочтение отдают 76%-му раствору, особенно в тех случаях, когда важное значение имеет высокое содержание йода, например при аортографии, ангиокардиографии, коронарной ангиографии. Доза зависит от возраста, массы тела, сердечного выброса, общего состояния пациента, технических условий проведения исследования и объёма сосудистого пространства, который необходимо контрастировать. Для получения контрастных изображений крупных сосудов (лёгочных артерий, артерий области шеи, головы, почек, конечностей) вводят 30–60 мл препарата со скоростью 8–12 мл/с в локтевую вену и 10–20 мл/с в верхнюю полую вену. Для уменьшения времени контакта РКС со стенкой вены рекомендуется быстрое введение в тот же сосуд после введения амидотризоата 20–40 мл 0,9%-го раствора NaCl.

При проведении гистеросальпингографии РКС вводят непосредственно в канал шейки матки под небольшим давлением в объёме, достаточном для получения ка-

чественного изображения. У пациенток детородного возраста исследование проводят в предовуляторную фазу, т. е. между 7-м и 12-м днём менструального цикла.

При проведении компьютерной томографии (КТ) головы препарат, как правило, вводят внутривенно (болюсно либо инфузионно в дозе 1–1,5 мл/кг). Для аппаратов с невысокой скоростью сканирования рекомендуется двухфазное введение 100 мл препарата (50 мл примерно за 3 мин, остальное количество примерно за 7 мин), что создаёт относительно постоянную концентрацию амидотризоата в крови. При проведении КТ всего тела необходимое количество препарата и скорость введения зависят от исследуемого органа и возможностей прибора (время сканирования и воспроизведения изображения). При наличии прибора с небольшой скоростью сканирования предпочтительна инфузия амидотризоата, а при быстродействующем приборе — болюсное введение. В качестве солей амидотризоата наиболее часто в России используют Урографин — раствор для инъекций (ампулы) 60% и 76%, 20 мл.

Неионные контрастные средства для уро/ангиографии и визуализации полостей тела. В начале 1970-х годов прошлого столетия начинается эра неионных РКС. Первым из них является Амипак (метризамид), разработанный по замыслу шведского радиолога Альмена (1971), и не оправдавший себя в связи с нестабильностью. Дальнейшие исследования в области неионных РКС привели к созданию стабильного и достаточно хорошо переносимого препарата Омнипак. Потребовалось всего 3 года, и закономерным продолжением и развитием всех достоинств неионных РКС стало новое достижение учёных — препарат йопромид (Ультравист), отличающийся улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с Омнипаком (лучшая растворимость в воде, более низкие осмотичность и вязкость при одновременном повышении максимальной концентрации йода с 350 до 370 мг/мл). Положительные отзывы о хорошей переносимости и высокой эффективности препарата были опубликованы и продолжают публиковаться в научной прессе. Вместе с тем Минздравом России в последние годы были зарегистрированы другие неионные РКС — мономеры Ксенетикс (йобитридол), Сканлюкс (йопамидол), Омнипак (йогексол), Оптирей (йоверсол); димеры Визипак (йодиксанол) и Гексабрикс (йоксаглат) (ионный низкоосмотический препарат). Однако ни один из них не превосходит йопромид по своей универсальности, т. е. все они содержат более низкую концентрацию рентгенопоглощающего атома — йода и не имеют лучших характеристик переносимости.

Йопромид по сравнению с другими РКС обладает пониженной вязкостью, незначительной способностью связываться с белками плазмы крови и с биологическими мембранами, в том числе эндотелиальными, и наилучшей водорастворимостью (последнее позволило создать лекарственную форму Ультравист-370, в которой концентрация йода (370 мг/ мл) выше, чем в растворах других неионных РКС, применяемых в России (350 мг/ мл).

После внутривенного введения йопромид распределяется преимущественно во внеклеточном пространстве; выделяется, главным образом, почками. Через 24 ч более 92% препарата выводится из организма.

Преимущества характеризуются его свойствами, такими как

— лучшая общая переносимость;

— отличная нейрональная толерантность;

— минимальное влияние на сердечно-сосудистую систему;

— очень хорошая толерантность в отношении эндотелия и интимы сосудов;

— минимальное влияние на коагуляцию крови, фибринолиз и систему комплемента;

— высокая способность контрастировать мочевыделительную систему.

К низкоосмотичным препаратам относится также ионное димерное средство Гексабрикс (йоксаглат), уступающее всё же по своей безопасности неионным РКС. В экспериментах *in vitro* указанные РКС обнаруживают те или иные небольшие отличия, но для клиницистов наиболее важны результаты сравнительных исследований РКС у пациентов. Одно из таких исследований было проведено Х. Гольдштейном и др. на 1367 пациентах. При сравнении йопромида, йогексола, йоверсола и йопамидола было выявлено, что если контрастирующая способность при проведении церебральной артериографии у данных препаратов примерно одинакова, то по своей безопасности наилучшими свойствами отличается йопромид, который вызывал наименьшее число побочных реакций. Отметим, что большая безопасность йопромида по сравнению с другими неионными РКС, в частности Омнипаком, подтверждается результатами исследований их взаимодействия с белками плазмы. Показано, что Омнипак, в отличие от йопромида, при взаимодействии с глобулинами плазмы крови вызывает их дегидратацию, что может быть причиной нарушения их функциональной активности.

Вопросы безопасности использования РКС очень важны для детской практики, так как у детей, особенно младшего возраста, уменьшена выделительная способность почек. Поэтому им рекомендуется вводить неионные РКС. На кафедре детской хирургии Российского государственного медицинского университета за последнее десятилетие накоплен большой опыт использования неионных РКС при проведении ангиографической диагностики и рентгеноэндоваскулярного лечения у более, чем 5000 детей в возрасте от 3 дней до 14 лет. При использовании йопромида (средняя доза болюсно вводимого Ультрависта-370 — 3 мл/кг) при выполнении ангиографических исследований по поводу различной патологии (сосудистые мальформации, пороки развития лёгких, печени, почек и конечностей) у всех больных получена чёткая визуализация сосудов интересующей зоны при отсутствии побочных реакций. Результаты изучения влияния йопромида на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (ЭКГ, поликардиография, периферическая реовазография), а также на осмолярность крови, её реологические показатели (агрегация эритроцитов, ригидность их мембран, кессоновская вязкость) и биохимические параметры, характеризующие функцию печени и почек, в сравнении с ионными РКС свидетельствуют о значительных преимуществах йопромида в отношении снижения риска проведения искусственного контрастирования. При этом важно подчеркнуть, что использование йопромида по сравнению с ионными РКС уменьшает чувство дискомфорта у детей, снижает величину их непроизвольных движений, способствующих возникновению артефактов, и улучшает визуализацию анатомических структур.

Продолжая поиск новых низкоосмотических РКС, исследователи решили пойти по пути создания димерных неионных РКС. Первым таким препаратом стал Изовист (йотролан) фирмы Шеринг, вторым — Визипак (йодиксанол) фирмы Никомед. Димерные неионные РКС по сравнению с мономерными неионными имеют меньшую осмотичность (они изоосмотичны плазме крови), но обладают более высокой вязкостью (вязкость йотролана и йодиксанола в зависимости от концентрации раствора достигает 11 сПуаз, а мономерных неионных РКС при соответствующих концентрациях йода — примерно в 2 раза меньше). Вязкость нормальной крови равна 4 сПуаз, а плазмы 1,2 сПуаз. Для РКС с более высокой вязкостью необходимо большее давление при инъекции. Более вязкое контрастное средство может привести к замедлению кровотока и, следовательно, к увеличению времени аноксии после болюсного введения препарата в сосудистое русло и к увеличению времени контакта молекулы РКС с эндотелием. Микроциркуляторные нарушения, вызываемые РКС, обусловлены как их гиперосмотичностью, так и повышенной вязкостью. Димерный препарат йодиксанол (вязкость — 5,8 мПа · с, осмоляльность — 290 мосмоль/кг H_2O) снижает

скорость движения эритроцитов в капиллярах на 60,8 %, а мономерный неионный препарат иопентол (вязкость — 1,7 мПа · с, осмоляльность — 340 мосмоль/кг H_2O) на этот параметр не влияет. Следовательно, получается, что преимущество димерных неионных РКС в осмотичности нейтрализуется их более высокой вязкостью, по сравнению с мономерными неионными РКС.

Анализ физико-химических свойств димерных и мономерных РКС показывает, что практически невозможно создать рентгеноконтрастный препарат на основе трийодированного ароматического кольца, который бы в совокупности имел какие-либо выраженные преимущества по сравнению с существующими мономерными неионными РКС.

Имеющиеся клинические данные также подтверждают данное положение. В работе M. Carraro и др. проведено сравнение димерного неионного препарата йодиксанола и мономерного неионного препарата йопромида в отношении их контрастирующей способности и безопасности у больных с почечной недостаточностью при проведении внутривенной урографии. Обнаружено, что в целом у исследуемых групп больных между указанными РКС нет статистически значимых различий в изменении активности аланинаминопептидазы и N-ацетил-β-глюкозаминидазы в моче, секреции с мочой α-1-микроглобулина и альбумина и в уровне креатинина в сыворотке, т. е. в их нефротропном действии. Тем не менее, в одном случае наблюдалась транзиторная нефропатия, вызываемая РКС (после введения йодиксанола).

F. Kribben и др. определяли уровень креатинина в сыворотке через 2 дня после внутрисосудистого введения 200 больным с нормальной функцией почек йодиксанола (средняя доза 450 мл) или йопромида (средняя доза 425 мл). Авторами обнаружено, что оба препарата в равной степени вызывают небольшое (около 20 %) увеличение концентрации креатинина в сыворотке.

В то же время существуют работы, в которых авторы отмечают большую способность димерных РКС увеличивать рентгеновскую плотность почечных лоханок по сравнению с мономерными РКС. Теоретически это обусловлено меньшим диуретическим эффектом димерных РКС и вследствие этого их большей способностью концентрироваться в моче. Однако следует иметь в виду, что димерные препараты, по сравнению с мономерными, сильнее снижают микроциркуляцию в мозговом слое почек и уменьшают скорость клубочковой фильтрации, а также вызывают вакуолизацию в клетках проксимальных канальцев почек у экспериментальных животных. При сравнении в клинике йодиксанола и йопромида Stacul и др. (1998) отмечают большую способность димерного препарата контрастировать лоханки и сосочки почек, а по параметрам визуализации границ почек, плотности нефрограмм и контрастирования собирательных протоков и визуализации мочевого пузыря эти РКС между собой не различались.

Согласно данным Luebkemann и др., между йопромидом и йодиксанолом нет статистически значимой разницы в способности вызывать побочные эффекты (тошнота, рвота, отёк слизистых, бронхоспазм, сыпь на коже) при проведении коронарной ангиографии у 328 больных. К таким же выводам пришли D. Baumgart и др. при анализе результатов левосторонней кардиографии у 202 пациентов. Ими не было обнаружено статистически значимой разницы в гемодинамических параметрах после введения йодиксанола и йопромида. Хотя субъективно йодиксанол (3 %) вызывал меньше болевых реакций в сердце, чем йопромид (13 %).

Следовательно, мы не можем утверждать, что существуют заметные различия, как в отношении развития побочных реакций, так и в отношении контрастирующей способности, между димерными и мономерными неионными йодсодержащими РКС.

Более десяти лет тому назад появились сведения о способности РКС вызывать так называемые отсроченные побочные реакции, которые развиваются через 1 ч — 2–3 дня после проведения рентгеноконтрастного исследования.

Согласно рандомизированным исследованиям отсроченные побочные реакции вызываются ионным РКС в 2,9–5,0%, а неионными РКС в 2,2–18,4% случаев. При этом реакции немедленного типа вызываются ионными РКС в 4,17–12,66%, а неионными РКС в 0,69–7% случаев.

В Японии в 1992 г. было проведено сравнительное исследование по выявлению поздних побочных реакций, возникавших после применения ионных и неионных мономерных и димерных РКС. Отсроченные побочные реакции считались доказанными, если были описаны в медицинском отчёте в течение 5 дней после проведения исследования. Как было отмечено, большинство таких реакций произошло в течение двух дней после процедуры, и они отмечались в 5,0% случаев при применении ионных РКС и в 4,9% при использовании неионных РКС. Причём в ряде случаев димерные РКС вызывают эти реакции даже чаще, чем мономерные неионные препараты.

Согласно данным H. Renz, отсроченные побочные реакции, вызываемые РКС, имеют иммунопатологическую природу и представляют собой либо псевдоаллергические реакции (реакция гиперчувствительности 1-го типа; она происходит через 4–8 ч после введения ксенобиотика и обусловлена выходом эозинофилов и лимфоцитов из сосудов в места аллергической реакции) и/или реакции гиперчувствительности 3-го типа (эти реакции возникают через 6–12 ч после введения ксенобиотика и происходят в результате активации системы комплемента, нейтрофилов и макрофагов). Наиболее часто поражается кожа и лёгкие, причём было отмечено, что развитие высыпаний на коже, так же как и развитие других признаков, не различалось между отдельными классами РКС. При анализе полученных данных по развитию отсроченных побочных реакций не было найдено никакой корреляции с развитием реакций немедленного типа, аллергиями и предыдущими побочными реакциями на РКС.

При сравнении частоты развития острых и отсроченных побочных реакций после внутривенного или внутриартериального введения РКС было отмечено, что в первом случае реакции возникают у 1,2%, в то время как реакции замедленного типа у 4,7% пациентов. При внутриартериальном введении наблюдается рост числа острых реакций до 7,4%, в то время как число отсроченных реакций оставалось практически неизменным — 4,8%. Среди пациентов выделялась особая группа: женщины и пациенты от 40 до 60 лет, которые были наиболее подвержены реакциям замедленного типа. Фактором риска для развития этих реакций являлось наличие таких заболеваний, как диабет, поражения сердца, печени и почек.

Согласно данным H. Yoshikawa, число отсроченных реакций, вызываемых неионными РКС составляет 7,3%, а немедленных реакций — 3,8%. По другим данным, соотношение частоты возникновения этих реакций равно 4 : 1. После урографии отсроченные реакции возникают чаще (2,25%), чем после других внутрисосудистых исследований (0,8–1%).

Последние результаты исследований замедленных побочных реакций, возникающих при использовании неионных РКС при проведении компьютерной томографии, говорят о том, что они возникают в 12,4% случаев и не зависят от типа РКС. Таким образом, несмотря на появление в последние десятилетия не только мономерных, но и димерных неионных РКС, трудно выделить наилучший неионный препарат, поскольку их фармакологические свойства близки.

Если между ионными ангиоурографическими РКС типа амидотризоата и неионными мономерными РКС типа йопромида и йогексола существует значительная статистически достоверная разница в плане безопасности их использования и переносимости у пациентов (это преимущество неионных РКС оправдывает их большую

стоимость, обусловленную более сложной технологией синтеза), то различий между неионными мономерными и димерными препаратами в аспекте диагностической эффективности и безопасности практически нет. В подавляющем большинстве работ статистически достоверных различий между неионными мономерными и димерными препаратами не выявлено, а если о ней и говорят, то только на основании неправильной интерпретации данных по степени контрастирования некоторых органов. Она может быть различной, если её сравнивать в одно и то же время после введения РКС, — неионные мономеры быстрее выводятся из кровотока и поэтому быстрее создают максимальную контрастность, а неионные димеры медленнее выводятся и дают максимальную контрастность позднее. Различие в стоимости (в данном случае, на отечественном рынке, стоимость димерного препарата примерно на 30% выше мономерных неионных РКС) указывает на целесообразность использования в мономерных неионных РКС.

Среди неионных мономерных РКС, разрешённых для применения в Российской Федерации, наименьшей осмотичностью, наилучшей переносимостью и наивысшей концентрацией йода (наилучшей диагностической эффективностью) обладает йопромид.

Йопромид (iopromide) по сравнению с другими РКС обладает пониженной вязкостью, незначительной способностью связываться с белками плазмы крови и биологическими мембранами, в том числе эндотелиальными; воздействие на гемокоагуляцию, фибринолиз и систему комплемента минимальное. После внутривенного введения распределяется преимущественно во внеклеточном пространстве; выделяется главным образом почками. Через 24 ч более 92% препарата выводится из организма. Обладает лучшей общей переносимостью по сравнению с ионными РКС.

Все марки йопромида используют для искусственного контрастирования при КТ, цифровой субтракционной ангиографии, внутривенной урографии, флебографии конечностей, венографии, артериографии, для контрастирования полостей тела (артрографии, гистеросальпингографии, фистулографии и др.). Кроме того, Ультравист-240 можно применять для искусственного контрастирования при нейрорентгенологических исследованиях субарахноидальных пространств головного и спинного мозга (миелографии, компьютерной миелографии). При ангиокардиографических исследованиях в качестве РКС лучше использовать Ультравист-370.

Рекомендуемые марки йопромида (Ультрависта) для проведения тех иди иных диагностических исследований приведены в табл. 15.6.

Доза йопромида при проведении ангиографических исследований зависит от возраста и массы тела пациента, диагностической задачи, вида технического оборудования, а также вида и объёма исследуемой сосудистой области (табл. 15.7).

Для проведения цифровой субтракционной ангиографии крупных сосудов, лёгочных артерий, артерий области шеи, головы, почек и конечностей используют Ультравист-300 или Ультравист-370 в объёме 30–60 мл, вводимый со скоростью 8–12 мл/с в локтевую вену или 10–20 мл/с через катетер в верхнюю полую вену. Время соприкосновения РКС со стенкой вены можно сократить при условии быстрого введения непосредственно после йопромида 20–40 мл 0,9% раствора NaCl. Внутриартериальная цифровая субтракционная ангиография в отличие от внутривенной, требует введения меньшего количества и концентрации йопромида. Этот вид цифровой субтракционной ангиографии рекомендуют применять у больных с пониженной функцией почек.

Для проведения КТ головы рекомендуют следующие дозы: Ультравист-240 — 1,5 мл/кг (максимально 2,5 мл/кг), Ультравист-300 — 1 мл/кг (максимально 2 мл/кг), Ультравист-370 — 1 мл/кг (максимально 1,5 мл/кг). Рекомендуемые сроки проведения КТ головы с использованием йопромида приведены в табл. 15.8.

Таблица 15.6

Рекомендуемые марки Ультрависта для проведения диагностических исследований

Вид исследования	Марка Ультрависта
Ангиография дуги аорты	300/370
Ангиография головного мозга	300/370
Селективное контрастирование сосудов головного мозга	300
Торакальная ангиография	300/370
Ангиокардиография: взрослые дети	 370 300/370
Брюшная аортография	300/370
Селективное контрастирование сосудов брюшной полости	300/370
Ангиорафия конечностей: артериография флебография восходящая флебография ног и таза	 240/300 240/300 240/300
Цифровая субтракционная ангиография КТ	240/300/370
Внутривенная урография	240/300/370
Нейрорентгенологические исследования субарахноидальных пространств: головной мозг спинной мозг	 240/300/370 240

При КТ всего тела необходимая доза контрастного вещества и скорость введения зависят от органа и диагностической задачи, а также от вида томографа. При работе с аппаратами медленного действия предпочтение следует отдавать внутривенному инфузионному введению РКС, а при использовании быстродействующих сканирующих приборов — одноразовому внутривенному введению с большой скоростью. В табл. 15.9 представлены марки йопромида и дозы, используемые для проведения диагностических исследований внутренних органов, а также способы введения РКС.

При проведении диагностических исследований почек и мочевыводящих путей пациентам со средней массой тела Ультравист-300 вводят в дозе 1 мл/кг. В отдельных случаях, особенно при ограничении функции почек, допускается использование больших объёмов РКС. Детям в связи низкой концентрационной способностью почек необходимы относительно высокие дозы йопромида (табл. 15.10).

Сроки выполнения снимков после введения 50 мл Ультрависта-300 или Ультрависта-370 при продолжительности введения 1–2 мин (или 100 мл Ультрависта-240 за 3–5 мин) составляют для паренхимы почек 3–5 и 5–10 мин соответственно, а при исследовании системы почечных чашек, лоханок и мочеточников — 8–15 и 12–20 мин после начала введения РКС. Чем моложе пациент, тем раньше нужно производить снимок. Для грудных детей и детей младшего возраста первый снимок следует производить примерно через 5 мин после введения (продолжительность введения РКС 2–3 мин).

Таблица 15.7

Рекомендуемые дозы Ультрависта для проведения ангиографических исследований

Вид исследования	Марка Ультрависта	Доза, мл
Ангиография дуги аорты	300	50–80
Ретроградная ангиография сонной артерии	300	30–40
Селективное изображение сосудов головного мозга	300	6–15
Грудная аортография	300	40–60
Брюшная аортография	300	40–60
Артериография верхних конечностей	300	8–12
Венография верхних конечностей	240 (300)	50–60 (15–30)
Артериография нижних конечностей	300	20–30
Венография нижних конечностей	240 (300)	50–80 (30–60)
Селективная ангиокардиография в отдельных полостях сердца	370	40–60
Коронарная ангиография	370	5–8

Таблица 15.8

Рекомендуемые сроки проведения КТ головы с использованием йопромида

Объекты исследования	Срок начала сканирования после окончания введения контрастного средства
Артериовенозные поражения сосудов, аневризмы и другие виды сосудистой патологии	Непосредственно после введения контрастного средства, но не позднее 5 мин
Богато васкуляризованные опухоли	Около 5 мин после введения контрастного средства
Бедно васкуляризованные объекты	Через 10–15 мин

При проведении миелографии доза Ультрависта-240 не должна превышать 12,5 мл. Чем больше пациент двигается или напрягается иным способом после введения препарата, тем скорее контрастное вещество перейдёт в кровоток области, не являющейся объектом проводимого исследования. Вследствие этого, плотность контрастирования в таких условиях снижается быстрее обычного. После окончания исследования контрастное вещество следует направить в поясничную область. Это достигается за счёт принятия вертикального сидячего положение или поднятия головы на 15° от уровня кровати на период не менее 6 ч. После этого больной должен отдыхать около 18 ч во избежание появления любого дискомфорта. В течение этого периода рекомендуется наблюдение за возникновением возможных побочных эффектов. Больные с подозрением на снижение судорожного порога должны находиться под особенно тщательным наблюдением в течение нескольких часов.

Таблица 15.9

Дозы Ультрависта, рекомендуемые для проведения диагностических исследований полостей тела

Вид исследования	Марка Ультрависта	Доза, мл, и способ введения
Артрография	240/300/370	5–15, в полость сустава
Гистеросальпингография	240/300/370	10–25, в полость матки
Эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография	240/300	10–30, через эндоскопический зонд
Галактография (дуктография)	240/300	1–3, через млечные протоки
Исследование пищевода, желудка, кишечника	300/370	10–100, через рот

Таблица 15.10

Дозы Ультрависта при проведении внутривенной урографии у детей

Возраст	Количество йода, г/кг	Доза Ультрависта-240, мл/кг	Доза Ультрависта-300, мл/кг	Доза Ультрависта-370, мл/кг
Новорождённый (меньше 1 месяца)	1,2	5	4	4
Младенческий (1 месяц — 2 года)	1,0	4,2	3	3
Детский (2 года — 11 лет)	0,5	2,1	1,5	1,5

15.1.2. Фармакологические свойства рентгеноконтрастных средств. Для правильного клинического применения РКС необходимо иметь всесторонние сведения об их фармакодинамических и фармакокинетических свойствах, определяющих диагностическую эффективность и переносимость препарата.

Принципы контрастирования. При просвечивании организма рентгеновскими лучами изображение на фотографической плёнке формируется в результате неодинаковой способности тканей поглощать эти лучи. Поглощение рентгеновских лучей зависит от атомного номера атомов, входящих в структуру биомолекул, и толщины биоструктуры. В случае грудной клетки различия в структурообразующих атомах и их концентрации позволяет получать изображение костей, воздухоносных путей и сердца. В то же время в других тканях, например, в желудке, составные части органа имеют одинаковую способность поглощать рентгеновские лучи и для их визуализации необходимо дополнительно использовать вещества с иными рентгенопоглощающими свойствами. В качестве таких веществ можно использовать соединения с очень низкой плотностью (газы), которые называют рентгенонегативными РКС, или соединения с очень высокой плотностью (обычно содержат атомы с большим атомным номером — барий, йод), которые называют рентгенопозитивными РКС.

При введении РКС в полости степень их контрастирования зависит от концентрации используемого контрастного средства. В то же время при проведении урографии или холеграфии контрастная плотность зависит от функциональной активности исследуемого органа. В последних случаях одновременно изучают морфологию и функ-

цию органа. Например, замедление элиминации РКС почками свидетельствует о нарушении клубочковой фильтрации, связанном с острым или хроническим процессом.

Другой принцип использования РКС относится к компьютерной томографии. Этот принцип заключается в обязательном использовании РКС, которые существенно улучшают визуализацию морфологии паренхиматозных органов, повышая достоверность дифференциального диагноза и позволяя в некоторых случаях судить не только о природе патологического процесса, но и об его этиологии. Патофизиологической основой диагностической ценности РКС при КТ является изменение кровоснабжения патологических очагов, а также изменение проницаемости эндотелия сосудов при той или иной патологии. Вследствие этого происходит изменение не только самого накопления РКС в патологическом очаге, но и динамики контрастирования (скорости аккумуляции и вымывания контрастного вещества). Созданные недавно быстрые сканеры, имеющие несколько рядов детекторов, и использование высококонцентрированных РКС (например, Ультравист-370), вводимых с помощью автоматических инжекторов, дополнительно позволяет оценивать кровоснабжение органа при регистрации первого пассажа болюса РКС в зоне интереса, а также получать трёхмерное изображение сосудистого русла.

При ангиографии непосредственное введение РКС в сосуд с помощью катетера позволяет селективно визуализировать детальное строение и проходимость отдельных сосудов или их анастамозов.

Дигитальная (цифровая) субтракционная ангиография (ДСА) основана на вычитании изображения сосудов без контрастирования из их изображения в момент максимального содержания в них РКС. Она имеет существенные выгоды благодаря возможности использовать меньшие дозы РКС и получать изображение только сосудистого русла без влияния теней окружающих тканей (например, костей). Необходимые концентрации контрастных средств при различных видах лучевой диагностики представлены в табл. 15.11.

Таблица 15.11

Концентрации контрастных средств, необходимые для визуализации при различных видах лучевой диагностики

Метод лучевой диагностики	Концентрация контрастного средства
Рентгенография	50 мкмоль/л
Цифровая субтракционная ангиография	25 мкмоль/л
Компьютерная томография	2,5 мкмоль/л
T_1-МРТ	0,1 мкмоль/л
T_2-МРТ	0,01 мкмоль/л
Лазерная томография	1 мкмоль/л

С помощью ДСА и многослойной КТ можно получать изображение даже крупных артерий после внутривенного введения РКС. Для этой цели лучше всего подходят современные мономерные неионные РКС типа Ультрависта-370, которые следует быстро вводить в больших дозах, и поэтому важно, чтобы контрастный препарат имел низкую вязкость и низкую осмотическую активность.

Некоторые практические рекомендации по использованию РКС представлены в табл. 15.12.

Таблица 15.12

Некоторые практические рекомендации, связанные с клиническим применением РКС

Требуемые условия хранения РКС	В тёмном месте Вдали от рентгеновского аппарата При нормальной комнатной температуре (15–25 °С) В термостате (37 °С) не более 3 месяцев
Осмотр раствора РКС перед использованием	Доставать из упаковки только перед использованием Проверить степень прозрачности раствора (изменения цвета раствора, появления мутности или осадка быть не должно)
Обнаружение кристаллизации раствора	При низких температурах (зимой) может происходить кристаллизация раствора РКС, которая исчезает при непродолжительном нагревании при 80 °С
Растворы РКС с большой вязкостью	Нагревание раствора до 37 °С снижает вязкость и позволяет легче вводить препарат
Риск микробного загрязнения	Нельзя держать открытой ампулу или флакон с РКС более, чем в течение 1 дня. Оставшийся неиспользованным раствор РКС к концу дня следует выбросить
Повторная стерилизация раствора РКС	Открытые ёмкости с РКС повторной стерилизации подвергать нельзя
Перенос в стерильные ёмкости	Нельзя чистый раствор РКС закрывать нестерильной пробкой. Флакон с РКС должен быть всегда закрытым

Водорастворимые РКС обычно представляют собой готовые к употреблению растворы. При выборе препарата рентгенологу следует обращать внимание на тип и количество активной субстанции, место производства, концентрацию йода. Кроме активной субстанции и воды растворы РКС содержат вспомогательные вещества. К ним относятся $CaNa_2EDTA$ (кальций-динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), которая выполняет роль стабилизатора катализируемого следовыми количествами тяжёлых металлов, например Cu^{2+}, предотвращая отщепление йода от органической молекулы. $CaNa_2EDTA$ имеет преимущества по сравнению с Na_4EDTA, так как не связывает Ca и не вызывает снижение сократительной способности миокарда. Неионные препараты йопромида или Омнипака содержат $CaNa_2EDTA$ в концентрации 0,1 мг/мл. Для поддержания нужного pH в растворы РКС добавляют буферные вещества, например Трис-HCl. Растворы РКС для перорального применения могут содержать вкусовые добавки и эмульгаторы.

Влияние на лабораторные показатели. При изучении влияния растворов различных РКС на биохимические показатели сыворотки крови и мочи было обнаружено, что йопромид, Урографин или йогексол не влияют на определение активности аспартатаминотрансферазы GOT, GPT, GT, HBDH, CK, CKMB, GDH, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, холинэстеразы, амилазы и липазы в сыворотке крови, меглюмин-натриевая соль йоксаглата вызывает снижение активности GPT. Все отмеченные РКС не влияли на активность в моче ряда ферментов (лактатдегидрогеназы, N-ацетилглюкозидазы, щелочной фосфатазы, амилазы), но увеличивали плотность мочи. Йопромид не влиял на количественное определение белка в моче биуретовым методом, а другие РКС меняли указанные показатели. В отличие от йопромида другие РКС меняли количественное определение креатинина, мочевой кислоты, билирубина, глюкозы, холестерина и триглицеридов. Все изучаемые РКС влияли на количественное определение электролитов (особенно железа и меди)

в биологических жидкостях. В связи с этим образцы сыворотки или мочи для биохимического анализа следует брать до введения РКС или, по крайней мере, не ранее через 24 ч после их введения. У пациентов с нарушенной функцией почек в связи с задержкой элиминации РКС этот период следует увеличить.

Ангиоурографические РКС практически не влияют на метаболизм других веществ и на их транспорт кровью. Однако имеется возможность влияния на их экскрецию почками, особенно у больных с предшествующими заболеваниями мочевыделительной системы, так как такие РКС могут ухудшать экскреторную функцию почек. В особенности это относится к бигуанидам (метформину), которые элиминируют из организма исключительно почками. Поэтому, чтобы предотвратить риск развития лактацидлоза, связанный с замедлением экскреции биагунаидов, их приём следует прекратить за 2 дня до введения РКС и возобновлять только после нормализации почечной функции [27].

Пациентам с сердечной и почечной недостаточностью не рекомендуют введение фуросемида перед проведением рентгеноконтрастного исследования. У пациентов, которым вводили фуросемид (110 мг), ангиография приводила к повышению уровня креатинина с 145 ± 13 до 181 ± 16 мкмоль/л, но не влияла на него, если фуросемид не вводили.

При проведении кардиоангиографии с помощью ионных РКС имеется опасность развития кардиодепрессивного эффекта вследствие связывания кальция молекулами РКС. Эта опсность увеливиается у больных, которые лечатся блокаторами кальция (верапамилом).

Проведение миелографии неионными РКС усиливает возможность возникновения эпилептогенного эффекта нейролептиков (хлорпромазина). У больных, которых лечили интерлейкином-2, наблюдалось повышение частоты развития аллергоподобных реакций: лихорадки, тошноты, рвоты, диареи, кожной сыпи.

Фармакокинетика. При изучении фармакокинетики йодсодержащих РКС использовали метод получения соединений, меченных йодом-131 или йодом-125. Показано, что ангиоурографические средства триомбраст и йодамид преимущественно выделяются почками, а гепатотропные вещества билигност и билимин — печенью. При этом нефротропные РКС имеют меньшее сродство к белкам плазмы крови по сравнению с гепатотропными РКС [4].

В связи с этим специальному изучению был подвергнут характер взаимодействия РКС с белками плазмы. Установлено, что белками плазмы, с которыми более всего связываются органические йодосодержащие КС, являются альбумины сыворотки. Для исследования механизмов взаимодействия рентгеноконтрастных средств с сывороточным альбумином применялся комплекс физико-химических методов. С помощью методов флуоресцентных меток обнаружили, что холецистографические РКС (билигност, билимин, иопаноат, билиграм, эндобил), связывающиеся с альбумином с константой ассоциации 10^5–10^6 M^{-1}, индуцируют конформационные изменения белка.

На основании полученных результатов можно предположить, что взаимодействие рентгеноконтрастного вещества с альбумином приводит к конформационным изменениям последнего, вследствие чего микроокружение триптофанового остатка становится более гидрофобным.

Холеграфические РКС обратимо соединяются с альбумином в гидрофобной области, вблизи локализации триптофанового остатка: они либо изменяют степень ионизации других аминокислотных остатков, увеличивая вязкость водного слоя триптофана, либо непосредственно связываются в участке локализации триптофана.

Для детализации процессов связывания и выяснения роли отдельных участков молекул РКС в их комплексообразовании с белками плазмы мы применили метод ядерного магнитного резонанса (^1H), который позволяет следить за подвижностью протонсодержащих радикалов лиганда в процессе его связывания с макромолекулой. На основании экспериментально определяемых значений ширины спектральной линии на полувысоте $\Delta\nu_{1/2}$ для различных протонсодержащих радикалов РКС методом линейной регрессии рассчитали тангенс угла наклона зависимости уширения сигнала протонов той или иной группы РКС в присутствии белка от отношения концентрации белок/РКС в растворе, называемый коэффициентом эффективного связывания (КЭС). С помощью КЭС мы оценили участие различных химических групп РКС в комплексообразовании с белками плазмы. На протонных спектрах РКС были идентифицированы CH-пики бензольных колец и CH_2-пики углеродных цепей билигноста и эндобила, CH-пики бензольного кольца, CH_3-пик бокового радикала иопаноата, CH-пики бензольного кольца, CH_3-пик бокового радикала и CH_2-пик ближней к бензольному кольцу группы билимина, CH_3-пики триомбраста и йодамида.

Обнаружено, что добавление к растворам РКС альбумина в концентрации от $2 \cdot 10^{-4}$ до $8 \cdot 10^{-4}$ М во всех случаях приводит к уширению их пиков (с уровнем достоверности 0,95); общий диапазон изменения $\Delta\nu_{1/2}$ пиков был от 2 до 30 Гц. При этом общая концентрация лигандов превышала концентрацию альбумина не менее, чем на 2 порядка. В присутствии альбумина КЭС составлял от 21 ± 7 до 8867 ± 17.

Неодинаковое изменение значений КЭС при взаимодействии РКС с альбумином свидетельствует о различном участии тех или иных радикалов РКС в комплексообразовании. Анализ величин КЭС показывает, что основную роль в связывании РКС с альбумином играет бензольное кольцо; причём, чем меньше объём заместителей в третьем положении бензольного кольца, тем сильнее происходит его взаимодействие с белком.

Углеводородные цепи билигноста и эндобила также принимают участие в связывании с альбумином: КЭС центральных и ближайших к бензольным кольцам CH_2-групп билигноста примерно одинаков, а ближайших к бензольным кольцам CH_2-групп эндобила более, чем в 2 раза превышает значения для его центральных CH_2-групп.

CH-группа бензольного кольца иопаноата подвергалась очень сильной иммобилизации при связывании с альбумином, а CH_3-группа в боковой разветвлённой цепи связывалась в 3 раза слабее. Вклад CH-группы бензольного кольца и диметиламинометиленаминового радикала билимина в комплексообразование с альбумином примерно одинаков, а для радикала с карбоксильной группой — в 6 раз меньше.

Отсутствие высокого сродства к альбумину молекул РКС, имеющих заместитель не только в 3-м, но и в 5-м положении бензольного кольца свидетельствует о том, что связывающие участки альбумина комплементарны бензольному кольцу РКС с незаполненным 5-м положением.

При изучении взаимодействия РКС с другими белками плазмы было обнаружено, что все изученные РКС взаимодействуют с глобулинами плазмы, но лишь оральные холецистографические вещества вызывают выраженные конформационные изменения α- и β-глобулинов и фибриногена, которые могут привести к нарушению выполняемых этими белками функций: транспортной, ферментативной и т. п.

Наряду с белками плазмы, с которыми РКС связываются наиболее прочно, они взаимодействуют с эритроцитами, лейкоцитами и тромбоцитами. Каждое из этих взаимодействий требует специального внимания. Однако наибольшее число экспериментальных работ посвящено изучению влияния РКС на эритроциты, что объясняется превалированием красных кровяных клеток и той ролью, которую они могут играть в ряде побочных реакций, вызываемых РКС.

Наши усилия были направлены как на изучение механизмов взаимодействия РКС с эритроцитами, так и на выяснение возможных его последствий, выражающихся в нарушении микроциркуляции, имеющих место при проведении рентгеноконтрастных исследований.

Установлено, что ангиоурографические и холецистографические РКС по-разному взаимодействуют с эритроцитами. Первые слабо связываются с мембранами, но вследствие осмотической активности увеличивают регидность мембран, стабилизируя их; вторые — ингибируют активность Na^+–K^+-АТФазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что может приводить к накоплению радикальных продуктов, вызывая нарушение целостности мембран.

На основании сравнительного анализа зависимости снижения индекса деформируемости эритроцитов в присутствии РКС от величин осмоляльности растворов можно заключить, что выявленные эффекты билимина > триомбраста 78 % = йодамида 380 > билигноста 20 % > билигноста 50 % > метризамида обусловлены как их взаимодействием с мембранами, так и осмотичностью РКС. Полученные результаты указывают на значительно большую безопасность неионных РКС по сравнению с ионными в плане их способности влиять на деформационные свойства эритроцитов и тем самым на микроциркуляцию.

С помощью флуоресцентных методов было выявлено неспецифическое взаимодействие РКС с тромбоцитами и лимфоцитами крови. Величина данного взаимодействия, определяемая по тушению флуоресценции белков тромбоцитов и лимфоцитов и по их способности вытеснять флуоресцентный зонд АНС из связи с клеточными мембранами, коррелировала с гидрофобностью (коэффициент распределения октанол/вода) РКС. С нашей точки зрения, именно данные взаимодействия РКС с тромбоцитами и белыми клетками крови являются причиной снижения агрегации тромбоцитов, высвобождения анафилатоксинов: серотонина, гистамина, лейкотриенов и др.

Основной молекулой, связывающей с высоким сродством контрастные препараты, является сывороточный альбумин. Такое взаимодействие должно сопровождаться изменением одной из важных функций альбумина — транспорта физиологически активных веществ и, в частности, билирубина. Комплексообразование с этим белком необходимо для предотвращения нейротоксических эффектов билирубина. По этой причине изучалась возможность конкурентных взаимоотношений между билирубином и РКС за связывание с сывороточным альбумином.

Изученные РКС по-разному влияли на интенсивность флуоресценции комплекса билирубин–альбумин, но ни одно РКС не изменяло положения максимума флуоресценции билирубина. Оральные холецистографические РКС иопаноат и билимин снижали интенсивность флуоресценции билирубина при соотношении лиганд/белок 0,5; 1 : 1; 2 : 1; 3 : 1. Билигност и эндобил, вводимые внутривенно, снижали величину флуоресценции билирубина при его соотношении с альбумином 2 : 1 и 3 : 1, но не 1 : 1. Ангиоурографические РКС — йодамид и триомбраст — не вызывали достоверного уменьшения флуоресценции комплекса билирубин–белок.

На основании найденных величин констант ассоциации взаимодействия билирубина с альбумином можно заключить, что билимин и иопаноат оказывают выраженное влияние на связывание билирубина с белком как на высокоафинном связывающем участке, так и на участке с меньшим сродством. Билигност и эндобил влияют на взаимодействие билирубина с альбумином в меньшей степени и преимущественно на слабосвязывающий участок альбумина для билирубина.

В связи с этим в клинике необходимо учитывать возможность увеличения уровня свободного билирубина в крови больных при проведении холецистографии с помощью РКС (особенно перорально вводимых).

Подводя итог результатам по изучению взаимодействия РКС с составными компонентами крови, отметим, что основной молекулой, связывающей РКС, является сывороточный альбумин. С другими белками плазмы и клеточными элементами крови РКС связываются значительно слабее, что имеет, по нашему мнению, определённое значение как для биотранспорта, так и для токсичности РКС.

Для изучения роли альбумина в органотропности РКС были проведены эксперименты с использованием срезов печени. Оказалось, что при отсутствии в среде альбумина имеет место угнетение поглощения билигноста срезами печени. В то же время альбумин не влиял на накопление в срезах печени триомбраста. Триомбраст и другие ангиоурографические вещества, не связанные с составными компонентами крови, могут подвергаться гломерулярной фильтрации и быстро выделяться с мочой, а связь билигноста и других холецистографических веществ с альбумином предотвращает их выделение почками. Благодаря медленному току крови в печени, по-видимому, происходит диссоциация комплекса РКС–альбумин, аналогично тому как это имеет место при гель-фильтрации на сефадексе. Время жизни комплекса билигност–альбумин, равное примерно 50 с, достаточно для взаимодействия свободного билигноста с синусоидальной мембраной гепатоцитов. Поэтому в дальнейших экспериментах наши усилия были направлены на выяснение механизмов взаимодействия РКС с клетками печени. Для этой цели мы использовали срезы печени и изолированные гепатоциты.

Рентгеноконтрастные вещества, используемые для орального и внутривенного введения при контрастировании желчных путей, в основном избирательно поглощаются печенью и экскретируются в желчь. Несмотря на интенсивные исследования в течение последних лет механизмов их печёночной элиминации, наши знания о том, как эти вещества попадают в печень, проникают в гепатоциты через синусоидальную мембрану, ограниченны. Механизм этого процесса требует детального изучения, так как избирательное поглощение рентгеноконтрастных средств клетками печени является, несомненно, важным этапом для их экскреции в желчь. Сложный процесс транспорта РКС в клетки печени состоит из трёх этапов:

1) проникновения РКС через плазматические мембраны в гепатоциты;
2) накопления РКС в клетках печени;
3) экскреции РКС в желчь.

Анализ экспериментальных данных показал, что лимитирующим этапом переноса билигноста из крови в желчь является не вход, а высвобождение его из клеток печени.

Обнаружено, что избирательная экскреция билигноста с желчью обусловлена наличием транспортных систем (переносчиков) как на синусоидальной, так и на каникулярной мембране гепатоцитов.

В результате проведённого экспериментального поиска было сформулировано положение о детерминации избирательного поглощения гепатотропных органических анионов печенью на уровне плазматических мембран гепатоцитов, в которых локализована транспортная система.

По мнению авторов, плазматические мембраны клеток печени принимают участие в первичном распознавании холецистографических РКС и транслокации их в клетку. Цитозольные белки и внутриклеточные структуры, такие как микрофилламенты и микротрубочки, отвечают за накопление этих веществ и за их внутриклеточный транспорт.

Исследования процессов транспорта в гепатоците билигноста, наиболее изученного и распространённого холангиохолецистографического средства, показали, что проникновение билигноста через синусоидальную мембрану идёт против электрохимического градиента и является энергозависимым. При этом в проникновении билигноста через синусоидальную мембрану клетки могут принимать участие две

системы: насыщаемая и ненасыщаемая. В клетке билигност связывается с цитозольными белками и с мембранными структурами. Во внутриклеточном транспорте билигноста принимают участие микротрубочки. Затем билигност, по-видимому, при участии переносчика выделяется в желчь через каникулярную мембрану.

Таким образом, гепатотропность билигноста и других холецистографических веществ определяется «узнаванием» на следующих уровнях клеток печени:

1) на синусоидальной мембране, в которой локализована транспортная насыщаемая система для органических анионов;

2) на белках-лигандинах в цитоплазме и субклеточных органеллах;

3) на каникулярной мембране, осуществляющей экскрецию органических анионов из клетки в желчь.

Общее ренальное выделение РКС определяется процессами клубочковой фильтрации, реабсорбции и канальцевой секреции. Ренальная экскреция РКС зависит от скорости их поступления в почки. Последняя, в свою очередь, обусловлена скоростью кровотока и свободной концентрацией РКС в плазме.

Ангиоурографические РКС, в основном, выделяются путём клубочковой фильтрации, а канальцевый транспорт имеет меньшее значение.

При низких дозах РКС (60 мг йода/кг) относительная роль их секреции в ренальной экскреции достаточно велика, а при большой дозе (6 г йода/кг) лишь малая часть РКС подвергается этому процессу. При больших дозах РКС значение клубочковой фильтрации возрастает вследствие того, что последняя идёт быстрее, чем канальцевая секреция.

Триомбраст, йодамид и другие ангиоурографические средства, слабо связывающиеся с альбумином и иными составными компонентами крови, быстро выделяются с мочой. Достаточно прочная связь билигноста и других холецистографических РКС с альбумином предотвращает их значительное выделение почками.

Установление механизмов экскреции различных рентгеноконтрастных веществ в почечных канальцах позволило определить возможное участие фильтрации и секреции в общем процессе ренального выделения рентгеноконтрастных веществ. Фильтрации подвергаются все вещества, не связанные с белками плазмы крови. Анализ зависимости секреции РКС от их физико-химических свойств позволяет заключить, что величина секреции коррелирует с их липидофильностью и уменьшается в ряду: билигност > йодамид > триомбраст. Такая зависимость объясняется тем, что при увеличении липофильности повышается сродство вещества к транспортной системе, а также увеличивается способность контрастных веществ проникать из крови в клетки канальцев путём пассивной диффузии.

Таким образом, нефротропность РКС определяют следующие факторы.

1. Связывание РКС с сывороточным альбумином; чем оно ниже, тем выше нефротропность.

2. Способность вещества фильтроваться в клубочках и секретироваться в канальцах. Нефротропные (урографические) РКС проникают в больших количествах в канальцы путём фильтрации и концентрируются в них вследствие реабсорбции воды.

Рентгеноконтрастные исследования в клинике проводятся у больных людей, в том числе подвергающихся лечению различными фармакологическими препаратами. В этой связи важно знать, как изменяется органотропность, а следовательно, и диагностическая эффективность РКС при тех или иных патологических состояниях или фармакологических воздействиях.

В качестве экспериментальных моделей в наших исследованиях были использованы фенобарбиталовая индукция и глицериновый нефрит. Выбор первой из них обусловлен, с одной стороны, широким использованием фенобарбитала в качестве

снотворного и противосудорожного препарата, а с другой стороны, имеющимися сведениями о его способности усиливать билиарную элиминацию ксенобиотиков. Выбор второй модели связан с необходимостью изучения причин снижения информативности экскреторной урографии при развитии патологических изменений в почках.

Фенобарбиталовая индукция. При проведении данной части работы мы учитывали ранее полученные результаты об ускорении исчезновения билигноста из крови при введении крысам фенобарбитала. Эти данные явились основанием для проверки целесообразности использования фенобарбитала для ускорения холангиохолецистографии с помощью билигноста в клинике. После трёхдневного введения больным фенобарбитала (0,1 г на ночь в течение 3 дней) проведены рентгенологические исследования желчевыводящей системы у 7 больных терапевтического отделения 6-й клинической больницы г. Москвы. Полученные результаты показали, что фенобарбитал способствует ускорению контрастирования желчного пузыря.

По-иному фенобарбитал влиял на фармакокинетику ангиоурографического вещества ^{125}I-триомбраста, для которого характерно преимущественное выделение из организма почками. Отмечена способность фенобарбитала угнетать скорость выведения ^{125}I-триомбраста почками: в течение 3 ч с мочой выделялось на 20% вещества меньше, чем в контроле.

В то же время фенобарбитал за такой же отрезок времени повышал выделение ^{125}I-триомбраста с желчью с $1{,}3 \pm 0{,}08$% до $5{,}1 \pm 0{,}1$% от введённой дозы. Таким образом, билиарный путь экскреции, не играющий значительной роли в выведении триомбраста из организма, не может компенсировать заметного снижения его выделения почками после фенобарбиталовой индукции.

Эксперименты на модели «фенобарбиталовая индукция» показали, что этот ксенобиотик значительно стимулирует холерез и в меньшей степени ингибирует диурез. Следствием описанных эффектов фенобарбитала является более сильное изменение фармакокинетики гепатотропного вещества билигноста, чем нефротропного вещества триомбраста, что предопределяет большую клиническую значимость предварительного введения фенобарбитала при проведении холецистографии по сравнению с ангиоурографией. Данное клиническое значение состоит в возможности двукратного ускорения проведения диагностической процедуры при одновременном снижении дозы билигноста на 30–40%.

При поражении почек глицерином компенсаторно повышается функция печени, что подтверждается увеличением скорости высвобождения ^{125}I-билигноста из срезов печени крыс на 29,5%, вызванным глицерином, в экспериментах *in vitro*.

Глицериновый нефрит. Глицериновый нефрит оказывал более сильное влияние на фармакокинетику ^{125}I-триомбраста, чем ^{125}I-билигноста. Во все сроки наблюдения (5–60 мин) концентрации ^{125}I-триомбраста в крови, печени и лёгких превышали значения, отмечаемые у интактных животных. При этом наблюдалось уменьшение выделения ^{125}I-триомбраста с мочой на 20% и общего его клиренса в 68 раз. У интактных животных концентрация ^{125}I-триомбраста в течение первого часа снижалась в 5,5 раза, а у животных с почечной патологией уровень ^{125}I-триомбраста в ткани почек оставался постоянным и был одинаковым как через 5, так и через 50 мин после его введения.

При почечной патологии, вызванной введением глицерина, экскреция ^{125}I-триомбраста с желчью не отличалась от таковой у контрольных животных. В обоих случаях отмечено постепенное нарастание содержания ангиоурографического средства в желчи, которое заканчивалось на тридцатой минуте наблюдения.

Обобщая полученные данные о фармакокинетике РКС в норме и в различных экспериментальных моделях, можно сделать вывод о том, что любые фармакопрепараты

и патологические состояния, влияющие на выделительную функцию печени и почек, будут изменять кинетику распределения РКС по органам и тканям и их элиминацию. Практическим врачам-рентгенологам необходимо учитывать возможность такого изменения как в плане коррекции динамики рентгенологического исследования, так и повышения опасности возникновения побочных реакций при замедлении выведения РКС из организма.

Способность липосом изменять органотропность и токсичность заключённых в них низкомолекулярных соединений привлекает внимание исследователей, занимающихся проблемами искусственного контрастирования.

В нашей работе была изучена фармакокинетика липосомных форм триомбраста и билигноста, меченных ^{125}I.

Липосомные РКС готовили в отделе клинической радиобиологии ЦНИРРИ МЗ СССР по методу обратимости фаз, используя в качестве РКС смесь немеченых и меченных ^{125}I — РКС (50 мг), к которой добавляли 100 мг яичного лецитина и 50 мг холестерина. Липосомы хранили под аргоном при 4 °С (препарат стабилен в течение 2 лет).

Нами обнаружено, что инкапсуляция триомбраста существенно изменяет его фармакокинетику у крыс. Если обычный ^{125}I-триомбраст накапливается преимущественно в почках и быстро покидает кровяное русло, то его липосомная форма (липотраст) имеет выраженную тропность к селезёнке и печени. Определение метки в крови животных после внутривенного введения липотраста показало двухфазный характер снижения радиоактивности в крови. Быстрая фаза характеризовалась периодом полувыведения ($t_{1/2}$), равным 8 мин; для медленной фазы элиминация РКС $t_{1/2}$ составил $213 \pm 17{,}6$ мин. Общий клиренс соответствовал 0,022 мл/мин. Кинетика элиминации липотраста в лёгких и почках была сходной с наблюдаемой в крови. В сердце, в мышцах, головном мозге, тимусе, ткани кишечника, надпочечниках, жировой ткани содержание ^{125}I-триомбраста через 5 мин после введения составляло около 1 % его концентрации в крови и спустя 3–6 ч падала до нуля.

Наиболее интенсивное накопление липосомального ^{125}I-триомбраста наблюдалось в селезёнке и печени. В селезёнке максимум радиоактивности регистрировался через 30 мин после введения препарата. Последующее снижение радиоактивности происходило с $t_{1/2} = 492 + 66{,}4$ мин. В печени высокое содержание ^{125}I-триомбраста регистрировалось в течение 6 ч; период полувыведения ^{125}I-триомбраста из печени составлял $430 \pm 66{,}8$ мин.

На основании полученных данных по фармакокинетике липотраста можно прийти к заключению о преимущественном накоплении препарата в печени и селезёнке, что позволяет в течение нескольких часов рентгенологически визуализировать эти органы.

Таким образом, липидные везикулы являются удобными носителями РКС, позволяющими направленно изменять их органотропность. Несомненно, что их следует отнести к новому классу РКС, который может существенно расширить диагностические возможности лучевой диагностики.

Основные положения теории органотропности РКС. Приведённые комплексные исследования по изучению механизмов биотранспорта РКС составными компонентами крови и клетками печени и почек позволили сформулировать ряд общих теоретических положений для тех физико-химических процессов, которые определяют избирательность их аккумуляции в желче- и мочевыделительных органах.

1. Для гепатотропных веществ характерно выраженное сродство к составным компонентам крови, главным образом к сывороточному альбумину.

2. Более медленный ток крови в печени, чем в почках, и наличие большого количества узнающе-транспортных систем на плазматических мембранах гепатоцитов обеспечивают захват гепатотропных веществ печенью.

3. Внутриклеточный транспорт РКС при участии цитзольных белков субклеточных органелл и микротрубочек и перенос РКС из гепатоцитов в желчь являются необходимыми этапами их билиарной экскреции.

4. Нефротропные РКС могут проникать в канальцы почек путём фильтрации и секреции. Концентрирование РКС в почках определяется реабсорбцией воды в канальцах.

5. Кинетика накопления РКС различными органами и тканями существенно меняется при изменении функционального состояния экскреторных систем под воздействием фармакологических веществ или токсичных соединений.

Разработанная теория органотропности РКС позволила определить возможные пути регуляции избирательности их накопления в тех или иных тканях и сформулировать положения, относящиеся к прикладным аспектам данной теории.

1. Предварительное введение больным фенобарбитала приводит к индукции билиарной экскреции билигноста, что позволяет ускорить процесс контрастирования желчевыводящей системы и снизить дозу билигноста на 30–40 %.

2. Помещение РКС (билигност, триомбраст) в многослойные липосомы изменяет их органотропность в сторону избирательного накопления контрастного материала в селезёнке и, в меньшей степени, в печени.

3. Математическое моделирование распределения РКС в организме позволяет прогнозировать кинетику их накопления в органах и тканях и оптимизировать использование контрастных веществ.

15.2. Магнитно-резонансные контрастные средства

Магнитно-резонансные контрастные средства (МРКС) представляют собой неотъемлемую часть клинической магнитно-резонансной визуализации (МРВ) или томографии (МРТ). Они значительно увеличивают объём диагностической информации, позволяя оценивать динамику патологических процессов с необходимыми временны́ми и пространственными разрешениями и открывают новые возможности в диагностике таких патологий, как функциональные нарушения микроциркуляции в сердце, головном мозге и других органах, не говоря уже о дифференциальной диагностике патологических процессов органического генеза [5, 8, 16].

Физические принципы МРТ. Практически все современные методы магнитно-резонансной визуализации основываются на получении сигнала от ядер атомов водорода живых систем. Обладая хорошими магнитными свойствами (гиромагнитное отношение протонов ^1H = 42,58 МГц/Тл), они широко представлены в любом биологическом объекте в высокой концентрации (относительная распространённость изотопа 99,98 %).

Вещества, имеющие в составе атомы с магнитными ядрами, в магнитном поле поглощают радиоволны соответствующих частот, зависящих от типа ядер, величины магнитного поля и магнитного окружения ядер, что является основой явления магнитного резонанса, используемого для получения МР-визуализации.

Для протонов в магнитном поле существуют два типа прецессии или конуса прецессии, сориентированные вдоль направления силовых линий магнитного поля. Первый — для ядер в состоянии с низкой энергией (стабильное состояние), и другой — в противоположном направлении — для ядер в состоянии высокой энергии

(нестабильное состояние). Частота прецессии определяется из уравнения Лармора:

$$f = \gamma \cdot B_0,$$

где f — частота Лармора (единица измерения МГц), γ — гиромагнитное отношение (единица измерения МГц/Тл), которое в соответствии с названием является механическим магнитным свойством ядра и зависит от типа ядра, B_0 — напряжённость магнитного поля (единица измерения Тл).

Для реальной живой ткани наблюдается суммарный эффект, который эквивалентен магнитному моменту M_0, который равен сумме магнитных моментов индивидуальных атомов (ядер), направленных вдоль внешнего магнитного поля B_0. Направление и величина этого магнитного момента не изменяются во времени, если на ткань не действует радиочастотный импульс.

После облучения радиочастотным импульсом (РЧИ) соответствующей частоты суммарная намагниченность протонсодержащего объекта (M_0) отклоняется от равновесного положения. Для возбуждения спиновой системы более эффективно воздействие радиоволнами большой интенсивности в короткий промежуток времени (импульсный магнитный резонанс). Частота радиоволн должна быть равна или близка частоте Лармора. Импульс, отклоняющий M_0 на 90° в плоскость XY, называется 90-градусным импульсом (90°-РЧИ). При облучении импульсом, как правило удвоенной длительности, называемым 180-градусным импульсом (180°-РЧИ), намагниченность изменяет своё направление на противоположное, т. е. инвертируется.

При прекращении действия поля ^{1}H-спиновая система самопроизвольно возвращается к термодинамическому равновесию за счёт процессов ядерной магнитной релаксации.

Процесс перехода из возбуждённого состояния в равновесное вследствие спин-решёточного (продольного) релаксационного процесса характеризуется временем спин-решёточной релаксации T_1 — временем, за которое спины протонов стремятся вернуться к направлению магнитного поля. Намагниченность в направлении z за время, равное T_1, достигает 63 % своей конечной максимальной величины.

Другой процесс релаксации, связанный с постепенной «расфокусировкой» спинов, характеризуется спин-спиновым (поперечным) временем релаксации T_2, за которое намагниченность в плоскости XY теряет 63 % от своей первоначальной величины.

МР-томограф позволяет получать изображения в трёх взаимно-перпендикулярных проекциях — поперечной (аксиальной), фронтальной (коронарной) и сагиттальной. Есть возможность получения изображения и в косых (наклонных) проекциях.

Величина поля изображения (английская абривиатура — FOV) составляет обычно 40 × 40 см, реально используют 30 × 35 см. Матрицу изображения изменяют от 128 до 256 элементов (пикселей) для получения квадратного элемента. Поскольку от размера матрицы зависит разрешающая способность прибора и время сканирования, то вопрос о выборе матрицы решается оператором в зависимости от конкретных целей.

На качество полученных изображений и время сканирования влияет также число усреднений сигнала. Пространственная разрешающая способность прибора зависит от матрицы регистрации. Для получения быстрых поисковых изображения используется матрица 128 × 128 элементов. Для получения основных изображений используют матрицу (190–256) × (224–272). Время получения изображения варьирует от 10 с до 12 мин — в зависимости от заданных временных параметров и программы исследования. Программы исследования заключается в получении аксиальных срезов в T_1 и T_2-взвешенных изображениях, коронарных и фронтальных срезов в T_2-взвешенных изображениях. На качество полученных изображений и время сканирования влияет также число усреднений сигнала. Увеличение количества усреднений повышает соот-

ношение сигнал/шум пропорционально квадратному корню из n (где n — количество усреднений сигнала), однако во столько же раз удлиняется время сканирования.

Для решения поставленных задач применяют различные импульсные последовательности: SE (спин-эхо), FSE (быстрое спин-эхо), FASE (специальная последовательность для получения сильно T_2-взвешенных изображений) и др. Перечисленные методики позволяют получать как T_1-взвешенные изображения (для изучения анатомо-топографического и морфологического состояния внутренних половых органов), так и T_2-взвешенные изображения (с целью выявления отдельных патологических изменений внутренних органов).

Импульсная последовательность «спин-эхо» позволяет получать высококачественные серийные взвешенные T_1- и T_2-изображения с различными значениями времени эхо. Одновременно можно получить до 20 срезов на разных уровнях, причём есть возможность варьирования промежутков между соседними срезами. Для получения T_1-взвешенных изображений необходимо проводить сканирование с коротким временем повторения (T_r) 250–500 мс и временем эхо (T_e) — 15–30 мс. От времени T_r и количества эхо-изображений зависит максимальное количество срезов, получаемых одновременно.

С помощью методики FSE возможно получение T_2-взвешенных изображений. Для этого необходимо задать длинные значения T_r (2000–4000 мс) и T_e (80–120 мс). Такие временные параметры позволяют лучше выявлять некоторые виды патологии. При использовании этой методики соотношение сигнал/шум значительно меньше, по сравнению с SE. Для компенсации этой потери необходимо увеличить число усреднений. Такой программой пользуются для ускоренного получения T_2-взвешенных изображений. Методика FSE позволяет получить 14 срезов за 4 мин с числом накоплений равным 4 (по методике SE с такими же временными параметрами изображения получаются за 60 мин).

Импульсную последовательность — FASE применяют для селективной визуализации неподвижной жидкости, близкой по своему составу к воде (моча, ликвор, фолликулярная жидкость), без применения контрастных веществ. С помощью этой методики получаются сильно взвешенные по T_2-изображения, на которых дают сигнал только субстанции с временем релаксации T_2 в несколько секунд. По этой причине большинство тканей не видны, и возможно, проведение исследования в большем объёме (толщина среза может достигать 30–100 мм). Эта особенность, а также то, что время исследования составляет 6–40 с, позволили выявлять «жидкосодержащие» образования яичников за короткий промежуток времени.

Для исследования естественно движущегося объекта (кровь) используют специальную импульсную градиентную последовательность (МР-ангиография) в двух модификациях. Первая — это времяпролётная модификация магнитно-резонансной ангиографии (МРА) (английская абривиатура TOF). Она представляет собой специальную методику, которая позволяет выявить движущийся во времени объект и присвоить ему соответствующую интенсивность МР-сигнала. С помощью этой методики, используя преднасыщение, есть возможность выделить кровотоки по направлению (т.е. разделить артериальный и венозный кровоток). Вторая — фазоконтрастная (английская абривиатура PS) модификация МРА основана на том, что движущиеся объекты при пересечении области магнитного резонанса изменяют фазу прецессии. С помощью этих методов получаются диагностически значимые изображения.

Внедрение МРКС в клиническую практику. Метод магнитно-резонансной томографии внутренних органов, внедрённый в клиническую практику около 25 лет тому назад, поднял современную медицину на качественно новый уровень. Это ещё раз было подтверждено в 2003 г. присуждением Нобелевской премии Paul C. Lauter-

bur из Соединённых Штатов Америки и сэру Peter Mansfield из Великобритании за их изыскательские работы в области магнитно-резонансной визуализации (МРВ). Всего лишь через несколько лет после появления МРТ учёные добились важного прорыва в совершенствовании этого вида лучевой диагностики, разработав контрастное средство для магнитно-резонансной визуализации и, тем самым, опровергнув первоначальное мнение, что для МРТ не нужны вещества для искусственного контрастирования. Сейчас магнитно-резонансные контрастные средства (МРКС) представляют собой неотъемлемую часть клинической МРВ, так как позволяют значительно увеличить объём диагностической информации.

В начале восьмидесятых годов прошлого века, когда началось внедрение МРТ в клиническую практику, имелись лишь теоретические представления и экспериментальные данные *in vitro* о способности парамагнитных соединений изменять способность окружающих протонов к релаксации, т.е. влиять на интенсивность магнитно-резонансного сигнала. При проведении ряда экспериментов на животных, которым вводили различные парамагнетики, в 1981 г. на томографе фирмы Сименс в Германии (Erlagen) была впервые выявлена способность хелатов металлов улучшать визуализацию при МРТ. Среди этих хелатов наилучшими характеристиками в отношении контрастирующей способности, местной и общей переносимости обладала ди-N-метилглюкаминовая соль гадопентетата — комплекса гадолиния с пентеновой кислотой (диэтилентриаминпентауксусной кислотой, ДТПА). Лекарственная форма этого хелата впоследствии была названа Магневистом. Благодаря высокой гидрофильности, Gd-ДТПА не проникает через клеточные мембраны и, в том числе, гематоэнцефалический барьер, быстро выводится почками, практически не вызывая побочных реакций [14, 16].

После рекордно коротких — в течение трёх лет — предклинических исследований и проведения 1-й фазы клинических испытаний с участием здоровых добровольцев в 1983 г. Магневист (димеглумина гадопентетат) начали вводить пациентам. Было показано, что Магневист быстро распределяется в сосудистой системе, проникая только во внеклеточное пространство. С 1983 по 1985 г. 2154 здоровых добровольцев и пациентов в различных медицинских центрах Европы, Японии и США приняли участие во II фазе клинических испытаний Магневиста. Полученные положительные результаты позволили продолжить клинические испытания Магневиста. Так, в IIIb–IV фазах приняло участие уже 13 349 пациентов. У 11 041 из них Магневист был использован для контрастирования области головы и позвоночника, а у 2398 — для контрастирования всего тела. При этом частота побочных реакций составила 1,15%. Как часть клинических испытаний было проведено двойное слепое исследование, в котором сравнивали Магневист (0,1 ммоль/кг) и плацебо (0,9% физиологический раствор). Принципиально важно, что частота и характер побочных реакций между ними оказались одинаковыми. Поэтому были все основания разрешить Магневист для широкого медицинского применения. В 1988 г. такое разрешение было получено в Германии, Японии и Соединённых Штатах Америки. Данное событие стало значительной вехой для медицинской диагностики и фармакологии, так как Магневист — это первый представитель совершенно нового класса лекарственных (контрастно-диагностических) средств, который в последующие годы непрерывно увеличивается, являясь одним из самых бурно развивающихся.

Начиная с 1988 г. Магневист остаётся наиболее применяемым препаратом для проведения магнитно-резонансной томографии. Первоначально Магневист использовали только при исследовании головного и спинного мозга, а затем и всего тела (Япония, 1992; США, 1993; ФРГ, 1993 и многие другие страны). Он был первым МРКС, разрешённым для применения у детей, включая новорождённых,

для введения в тройной болюсной дозе и для проведения магнитно-резонансной МР-ангиографии (МРА).

К 1993 г. число применений Магневиста достигло 100 млн, в 1997 — 20 млн, а в 2003 г. — 45 млн исследований. Сегодня в большинстве стран Магневист разрешён для использования в дозе до 0,3 ммоль/кг.

Механизм контрастирующего эффекта Магневиста заключается в том, что гадолиниевый ион уменьшает время спин-решёточной релаксации, увеличивая интенсивность сигнала и повышая контрастность изображения определённых тканей при использовании соответствующей последовательности сканирования (например, T_1-взвешенного спинового эха). Важно понимать, что улучшение контрастирования патологического очага Магневистом имеет в своей основе патофизиологические механизмы, связанные с нарушением сосудистой проницаемости, либо с изменением кровотока, либо с индукцией ангиогенеза. Именно поэтому Магневист позволяет получать отличную визуализацию метастазов опухолей в головном мозге (метастазы не имеют гематоэнцефалического барьера, в норме не проницаемого для внеклеточных МРКС), злокачественных опухолей в разных частях тела (такие образования имеют как большее число сосудов, так и сосуды с повышенной проницаемостью, что приводит к более быстрому накоплению и более быстрому вымыванию МРКС), рубцовых тканей (в них увеличено внеклеточное пространство и больше накапливается МРКС) и т. д. Как правило, объём диагностической информации, получаемый с помощью МРКС, можно значительно увеличить, изучая процесс контрастирования в динамике. Современные сверхбыстрые импульсные последовательности позволяют в непрерывном режиме следить за изменением интенсивности сигнала в зоне интереса и делать однозначные выводы не только о природе патологии, но и васкуляризации некоторых опухолей, а также прогнозе развития заболевания.

Димеглумин гадопентеновой кислоты представляет собой соединение с выраженными парамагнитными свойствами, сильно укорачивающее времена релаксации даже в низких концентрациях. Релаксационная активность, определяемая по влиянию на время спин-решёточной релаксации протонов плазмы, равна примерно 4,95 л/(ммоль · с). Он слабо зависит от напряжённости магнитного поля. Поэтому МРКС могут быть эффективно использованы как при работе на высокопольных, так и низкопольных магнитно-резонансных установках [7].

ДТПА образует прочный комплекс с парамагнитным ионом гадолиния с чрезвычайно высокой стабильностью ($\log K = 22$–23). Димеглуминовая соль гадопентетата характеризуется высокой гидрофильностью (коэффициент распределения *н*-бутанол/буфер при pH 7,6 равен примерно 0,0001). Это вещество практически не связывается с белками и не ингибирует активность ферментов (например, миокардиальную Na,K-АТФазу). Магневист не активирует систему комплемента и, следовательно, имеет очень низкую потенциальную способность вызывать анафилактоидные реакции.

Довольно скоро после внедрения в клиническую практику Магневиста появились и другие МРКС, которые способны изменять времена (или скорости) спин-спиновой T_2 ($1/T_2$) и спин-решёточной релаксации T_1 ($1/T_1$) протонов. По преимущественному влиянию на времена релаксации парамагнитные вещества разделяют на вещества, преимущественно влияющие на T_1 или T_2. Наиболее широко используемые парамагнитные агенты, представляющие собой хелатные комплексы Gd или других парамагнитных ионов, преимущественно влияют на T_1, увеличивая интенсивность МР-сигнала тканей-мишеней, «осветляя» область интереса на T_1-взвешенных изображениях, благодаря уменьшению T_1. А супермагнитные (например, оксид железа) и ферромагнитные частицы, обладая большим магнитным моментом, индуцируют локальные неоднородности поля, уменьшая тем самым преимущественно время T_2. При

этом получают негативное усиление, т. е. они делают область накопления препарата более тёмной, что наиболее ярко проявляется на T_2-взвешенных изображениях.

Другим принципом классификации МРКС является деление на основе особенностей их биораспределения. Имеющиеся данные о фармакокинетике МРКС свидетельствуют о целесообразности деления МРКС на внеклеточные (тканенеспецифические) и внутриклеточные или органотропные (тканеспецифичные) [6].

1. Внеклеточные вещества — вещества небольшого молекулярного веса, распределяющиеся во внеклеточном пространстве: T_1 (позитивные) вещества — Gd-ДТПА (гадопентат димеглюмина, Магневист) и другие хелатные комплексы парамагнитных ионов. В этой группе МРКС делят на полумолярные (гадопентетат, гадодиамид, гадотерат и др.) и одномолярные (единственный препарат — гадобутрол, Гадовист 1,0).

2. Внутриклеточные препараты, распределение которых связано с их взаимодействием с клетками. К ним относятся гепатотропные вещества (внутривенное введение), которые поглощаются гепатоцитами; они преимущественно влияют на T_1: Gd-ЕОВ-ДТПА (гадоксетовая кислота, Примовист).

Кроме того, к ним относятся вещества, поглощаемые клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Они преимущественно влияют на T_2-суперпарамагнитные частицы оксида железа (ферукарботран, Резовист).

Учитывая физические особенности МРКС, их можно разделить по их магнитной восприимчивости (индуцированной намагниченности), которая отражает характер их взаимодействия с внешним магнитным полем и связана не с магнитными параметрами ядер входящих в их состав элементов, а с характеристиками их электронных оболочек. Индуцированная намагниченность может быть ориентирована по отношению к внешнему магнитному полю либо хаотично — такие вещества называют диамагнетиками, либо вдоль направления магнитного поля — тогда это парамагнетики, супермагнетики, ферромагнетики или ферримагнетики.

Диамагнитная восприимчивость возникает из-за наличия спаренных электронов на внешней орбите. Она очень слабая и направлена хаотично по отношению к внешнему магнитному полю, поэтому многие диамагнитные органические и неорганические соединения нельзя использовать в качестве возможных МРКС, так как они не могут существенно воздействовать на МР-сигналы магнитных ядер (протонов). Тем не менее, некоторые диамагнитные материалы, такие как вода, жиры, перфторуглероды, углекислый газ и другие, могут быть использованы для изменения сигнала магнитного резонанса.

Парамагнетизм характеризуется независимым действием индивидуальных атомных или молекулярных магнитных моментов (за счёт неспаренных электронов на внешней электронной орбите), которые направлены хаотически в отсутствии внешнего поля и располагаются вдоль направления приложенного магнитного поля при его наличии. Парамагнетизм наблюдается в отдельных атомах или ионах, в группах атомов или ионов и в твёрдых телах. В современной медицине большинство созданных и разрабатываемых МРКС относятся к парамагнетикам, например ферритин, гемосидерин, минеральный поэтин (FeO(OH)).

Суперпарамагнитные материалы представляют собой кристаллы магнитных материалов, таких как магнетит и магмит, имеющих достаточно большой размер, чтобы формировать твердофазные микроскопические магнитные объёмы или «домены». Суперпарамагнитные материалы представляют собой простые домены кристаллов со специфическими свойствами, промежуточными между парамагнитными и ферромагнитными материалами. При этом восприимчивость суперпарамагнитных материалов намного больше, чем для парамагнитных материалов, и обратно пропорциональна температуре (закон Кюри). В отличие от ферромагнитных материалов, суперпарамаг-

нитные обладают свойством сохранения намагниченности после устранения действия внешнего магнитного поля.

Ферромагнитные и ферримагнитные частицы состоят из множества магнитных «доменов». Они также проявляют свойство остаточной намагниченности, описываемое петлёй гистерезиса. Если размер ферромагнитных (или ферримагнитных) кристаллов уменьшать до размеров «домена», то они становятся суперпарамагнитными веществами. Оксиды железа, используемые в МРТ как МРКС, принадлежат к суперпарамагнитным соединениям. Они содержатся в препарате Резовист, применяемом для контрастирования ретикуло-эндотелиальной системы.

Роль хелатов в стабильности МРКС. На сегодняшний момент в России зарегистрированы пять парамагнитных МРКС, состоящих из иона гадолиния и хелатного низкомолекулярного комплекса, которые успешно прошли клинические испытания. Магневист (гадопентат димеглюмин — $(NMG)_2$[Gd-ДТПА]), Дотарем (гадотерат меглюмин — NMG[Gd-ДОТА]) и Примовист (гадоксетовая кислота) являются заряженными, а Омнискан (гадодиамид — Gd-ДТПА-БМА — структурный аналог Gd-ДТПА), и Гадовист (гадобутрол — Gd-HP-DO3A, макроциклический аналог Gd-ДОТА) — являются нейтральными; их называют также неионными. Эти хелатные комплексы обладают низкой токсичностью. Известно, что на токсичность хелатов влияет также стабильность комплекса *in vivo*, которая является функцией четырёх факторов: их термодинамической стабильности, водорастворимости в присутствии преципитирующих анионов, степени селективности комплексообразования по отношению к ионам металлов и, наконец, их фармакодинамики.

Константа стабильности хелатов металлов отражает степень аффинности металлического иона к лиганду. Чем выше константа, тем более термодинамически стабилен комплекс.

Другим свойством, определяющим высвобождение металла из комплекса *in vivo*, является водорастворимость комплекса в присутствии преципитирующих анионов (фосфат, карбонат). Лиганды со слабым аффинитетом к иону металла могут диссоциировать, и, в результате, преципитирующая соль металла или коллоид вызывают токсические эффекты *in vivo*. Константой растворимости (K_p) для хелатных комплексов металлов является отношение растворимости иона металла в присутствии хелатирующего агента и преципитирующего иона. Комплексы с положительным значением $\log K_p$, такие как Gd-ДТПА-БМА и Gd-ДТПА, будут растворимы *in vivo* с соответствующей преципитацией, а комплексы с отрицательным значением — не растворимы. Нерастворимые комплексы имеют более продолжительное время существования *in vivo* и, вероятно, будут более токсичны, чем растворимые компллксы.

Наиболее важным критерием в определении потенциального высвобождения иона металла из комплекса является селективность хелатора к связанному иону металла по сравнению с другими эндогенными ионнами металлов, особенно цинком, концентрация которого *in vivo* достаточно велика — 10–50 мМ. Если селективность хелатора низкая, то, например, может происходить замещение иона Gd^{3+} в комплексе ионом Zn^{2+}, в результате чего наблюдаются токсические эффекты.

Скорость реакции трансметилирования хелатов металлов *in vivo* существенно более медленная, чем скорость ренального клиренса. Следовательно, хелатные комплексы значительно более биоинертны, чем это может казаться из величин их физико-химических показателей стабильности *in vivo*. Так, для макроциклических лигандов Gd-ДОТА и Gd-HP-DO3A высвобождение Gd^{3+} из комплекса *in vivo* — настолько медленный процесс, что в нормальных условиях комплексы выводится из организма до того, как может быть достигнуто равновесие реакции трансметилирования [28]. В таком случае факторы, которые могут уменьшать скорость клиренса

хелатного комплекса Gd^{3+} (нарушение функции почек, связывание с белками плазмы или конъюгация комплексов с другими макромолекулами и макрообъектами), имеют несомненное значение. Однако расчёты показывают, что даже в присутствии конкурентных металлов и комплексонов (таких как Zn^{2+} и цитрат) диссоциация Gd-ДТПА-БМА при введении в клинической дозе 0,1 ммоль/кг может приводить к высвобождению Gd^{3+} в концентрации не более 1,2 нмоль/л. Это количество Gd^{3+} является пределом возможности аналитических методов и биологически не значимо.

Осмоляльность является важной характеристикой раствора при введении его в кровеносное русло. Локальная боль в месте инъекции и другие побочные эффекты возникают при быстром введении высокоосмолярного (более 700 ммоль/кг воды) раствора. Нормальная осмоляльность крови и внеклеточной жидкости составляет около 290 ммоль/кг воды. Отметим, однако, что поскольку высокая осмоляльность важна только в случаях, которые требуют быстрого внутривенного введения препаратов в высоких дозах, что не является необходимым при использовании внеклеточных МРКС в большинстве случаев, то осмоляльность растворов МРКС, как правило, не имеет клинического значения. Именно в связи с этим Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США запрещает сравнительную рекламу МРКС по этому критерию.

Хелатирование необходимо для уменьшения токсичности иона металла, но при этом снижается количество внутрисферных молекул воды, координированных ионом металла, что уменьшает эффективность влияния парамагнетика на протонную релаксацию. В целом релаксирующая активность парамагнитных хелатов металлов состоит из двух компонент: внутрисферной и внесферной. При фиксированной рабочей частоте МР-томографа (или релаксометра) внутрисферная скорость релаксации ($1/T_{1,2}$) является функцией внутрисферного координационного числа (q), эффективного магнитного момента электронов металла, расстояния между парамагнитным ионом и ядром атома водорода молекулы воды (r) и временем вращательной корреляции.

В случае внесферной релаксации, т. е. релаксации молекул воды, непосредственно не взаимодействующих с ионом парамагнетика, влияние на которые осуществляется за счёт локального электромагнитного поля металла, важным фактором также становится обмен молекул воды между внутренней и внешней сферами комплекса и между внешней сферой и «свободной» от парамагнитного влияния водой, часть которой в организме чаще всего связана белками.

Таким образом, при создании новых хелатных комплексов необходимо учитывать доступность парамагнитного центра (т. е. величины q и r) для молекул воды. Отметим также, что релаксирующая эффективность парамагнитных комплексов в тканях организма, как правило, больше (так как подвижность протонов воды вблизи биомакромолекул ниже), чем в водных растворах.

15.2.1. Внеклеточные магнитно-резонансные контрастные средства

Фармакокинетика и контрастирующая активность. Выведение внеклеточных МРКС из организма осуществляется преимущественно почками (в норме — до 98%) путём гломерулярной фильтрации. Показано, что клиренс этих МРКС близок к клиренсу креатинина, поэтому с их помощью можно проводить оценку ренальной функции. При снижении почечного клиренса внеклеточных коммерческих МРКС у пациентов с нарушенной функцией почек наблюдается соответствующее увеличение времени их полувыведения из организма.

Поскольку внеклеточные МРКС не проникают в клетки, объём, в котором они распределяются вне кровянного русла, в норме составляет около 0,25 л/кг веса человека, что как раз эквивалентно объёму внеклеточной жидкости. Элиминация внеклеточных МРКС с грудным молоком является очень низкой (не превышает

0,05% введённой дозы). Данных о прохождении внеклеточных МРКС через эритроцитарную мембрану и о биотрансформации этих веществ в организме в полном объёме пока не получено. Не доказано наличие для них энтерогепатической рециркуляции и прохождение внеклеточных МРКС через интактные плацентарный и гематоэнефалический барьеры. Для большинства других тканей показана медленная пассивная диффузия через гистогематические барьеры, что имеет известное значение только при пролонгированном выведении внеклеточных МРКС из организма (например, при почечной недостаточности). В целом, фармакокинетическая зависимость эффективности влияния этих МРКС на релаксационные параметры тканей от времени линейна или пропорциональна вводимой дозе. Таким образом, на МРТ-изображении искусственное парамагнитное «усиление» при применении внеклеточных коммерческих МРКС следует ожидать для патологических тканей с нарушениями гистогематических барьеров при условии сохранности васкуляризации этих тканей.

Одной из актуальных задач клинического применения МРКС является оптимизация дозы МРКС и времени, через которое следует ожидать максимального усиления МРТ-сигнала, чтобы при введении наименьшего количества МРКС наблюдать достаточное контрастирование поражённой ткани или органа. В связи с этим интересно сравнить способность широко используемых в клинике магнитно-резонансных контрастных средств Магневиста и Омнискана влиять на спин-решёточную релаксацию протонов тканей.

МРКС вводили в хвостовую вену белых беспородных крыс в стандартной для клинического применения дозе 0,1 ммоль/кг веса тела. При экспериментах *in vitro* использовали концентрации МРКС 10^{-3}–10^{-2} М. Растворы МРКС доводились до необходимых концентраций с помощью фосфатного буфера (pH = 7,4). Времена спин-решёточной релаксации протонов воды (T_1) измеряли на протонном МР-релаксометре (ПМРР) Красноярск-88 (Россия) (импульсная последовательность «инверсия–восстановление»). Измерения проводили при температуре 27 °С (293 К).

В экспериментах использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г. обоего пола. После введения МРКС в хвостовую вену крыс забивали декапитацией под лёгким эфирным наркозом через 10, 20, 30, 60 мин. Для контроля крысам вместо МРКС вводили физиологический раствор (9% NaCl) в соответствующем объёме. На каждую точку приходилось не менее 3 животных, выбранных случайно. Полученные ткани и органы животных (кровь, печень, почки, мозг, сердце) помещали в ампулы (диаметр 8 мм) и производили измерение (T_1) [3].

Так как реальная релаксационная эффективность МРКС в биологических системах отличается от таковой в водных и буферных растворах, то возникла необходимость создания модельной системы, которая позволила бы с той или иной точностью предсказывать влияние МРКС в различных концентрациях на релаксацию ^{1}H воды в тканях и органах. В качестве модели использовали растворы сывороточного альбумина человека (САЧ) в фосфатном буфере, так как САЧ — это основной белок плазмы крови, которая наиболее близка по составу к интерстициальной жидкости.

In vitro были получены зависимости удельных изменений скорости спин-решёточной релаксации протонов в растворах Омнискана и Магневиста от концентрации МРКС в фосфатном буферном растворе (pH = 7,4) и в растворах с различной концентрацией сывороточного альбумина человека (САЧ). Диапазоны концентраций МРКС и САЧ составили $1{,}1 \cdot 10^{-3}$–$5{,}0 \cdot 10^{-2}$ М и $1{,}8 \cdot 10^{-4}$–$1{,}1 \cdot 10^{-2}$ М соответственно. Время T_1 релаксации ядер водорода для воды составило $2{,}49 \pm 0{,}05$ с. После добавления Магневиста и Омнискана в минимальной концентрации ($1{,}1 \cdot 10^{-3}$ М) в фосфатный буферный раствор и раствор САЧ времена спин-решёточной релаксации уменьшились ($p_{t,a} \geqslant 0{,}95$) в 12 раз. Дальнейшее увеличение количества МРКС приводило к ещё более существенному уменьшению времени T_1. Взаимодействие

Магневиста и Омнискана с молекулами воды значительно ускоряло процессы релаксации ядер ^1H воды за счёт парамагнитного влияния хелатного комплекса Gd^{3+}.

По этим данным были рассчитаны соответствующие коэффициенты пропорциональности между T_1 и концентрацией МРКС — константы, называемые коэффициентами эффективности релаксации (КЭР):

$$\frac{W_{\text{МРКС}} - W_0}{W_{\text{воды}}} = \text{КЭР} \cdot C_{\text{МРКС}}, \qquad (1)$$

где $W_0 = 1/T_{01}$ и $W_{\text{МРКС}} = 1/T_{1\,\text{МРКС}}$ — скорости спин-решёточной релаксации до и после введения МРКС, $W_{\text{воды}} = 1/T_{1\,\text{воды}}$ — скорости спин-решёточной релаксации воды в исходном растворе до добавления МРКС. Коэффициент эффективности релаксации (КЭР) вычисляется как тангенс угла наклона графиков зависимости удельного изменения скорости спин-решёточной релаксации $\Delta W'$ от концентрации $C_{\text{МРКС}}$ для растворов с различной концентрацией альбумина. Величину удельного изменения $\Delta W'$ находили по формуле $\Delta W' = \Delta W / W_{\text{воды}}$. Зная T_{01} легко найти КЭР, а затем из уравнения (1) вычислить $C_{\text{МРКС}}$. Коэффициент эффективности релаксации слабо зависит от частоты МР-сигнала томографа и применим для вычисления концентрации МРКС в любом органе или ткани.

При изучении зависимости коэффициента эффективности релаксации в водных и белковых растворах исследуемых МРКС от начальных релаксационных свойств раствора (T_{01}) было обнаружено, что коэффициент эффективности снижается с ростом T_{01}. Анализ полученных результатов показал, что с высокой степенью достоверности мы можем аппроксимировать зависимость коэффициента эффективности релаксации от начальных релаксационных свойств раствора в исследуемом диапазоне (от 0,219 до 2,5 с) в виде простой линейной регрессии.

Величины КЭР в растворах МРКС с различной концентрацией САЧ выявили достоверные различия ($p_{t,u} \geqslant 0{,}95$) в релаксационной эффективности Магневиста и Омнискана, увеличивающиеся с ростом концентрации САЧ в растворах, т. е. уменьшением в них относительной подвижности протонов и МРКС. При этом Омнискан в растворах САЧ имел несколько меньшую эффективность по сравнению с Магневистом.

Через 20, 30, 60 мин после введения Магневиста и Омнискана происходит уменьшение удельного изменения парамагнитного релаксационного воздействия веществ на кровь, причём эффективность Магневиста и Омнискана достоверно не различаются. В печени релаксационная активность Магневиста в первые 20 мин после введения МРКС достоверно (в 2–3 раза) выше, чем у Омнискана. Кроме того, через 20 и 30 мин после внутривенного введения МРКС в ткани печени мы наблюдали выраженные точки максимума релаксационной активности Магневиста и Омнискана (увеличение изменения скорости спин-решёточной релаксации протонов на 48–50 %), причём эффективность МРКС в точке максимумов у обоих веществ достоверно не различались. В тканях мозга для Омнискана небольшой максимум изменений релаксационных параметров (на 25 %) наблюдали на 20-й минуте после введения МРКС. В дальнейшем релаксационная активность Омнискана снижалась более выражено (30 и 60 мин — на 43 и 93 % соответственно), чем у Магневиста. Магневист выраженной точки максимума релаксационной эффективности не имел на протяжении всего времени исследования. В тканях почек Магневист по релаксационной активности достоверно эффективнее Омнискана на всём протяжении исследования (на 44–200 % соответственно). Для тканей сердца максимум удельного изменения скорости спин-решёточной релаксации для Магневиста и Омнискана наблюдали на 10–20-й минутах, при этом величины максимума обоих веществ по релаксационной эффективности достоверно не отличались. Затем эффективность релаксационного

влияния Магневиста была достоверно выше (на 75 %), чем у Омнискана, только на 60-й минуте после введения МРКС.

Удельное изменение скорости спин-решёточной релаксации ^1H крови, почек, сердца, мозга монотонно уменьшалось в течении 60 мин после введения Магневиста и Омнискана внутривенно в стандартной дозе 0,1 ммоль/кг веса. В ткани печени определяется максимум влияния Магневиста и Омнискана на релаксацию протонов ткани соответственно к 20-й и 30-й минутах после их внутривенного введения.

В целом, релаксационная эффективность МРКС к 10–20-й минутам (наиболее эффективное время получения МР-томограмм) в тканях крыс в норме снижается для обоих препаратов, но по-разному:

Магневист — почки > кровь и печень > сердце > мозг;

Омнискан — почки > кровь > сердце > печень > мозг.

Следует отметить, что для всех исследованных тканей (печени, почек, сердца, мозг) Магневист имеет бóльшую, чем Омнискан, эффективность действия после введения препаратов на всём протяжении исследования (10–60 мин). Это может быть связано как с большей способностью Магневиста влиять на времена релаксации протонов тканей (коэффициент эффективности релаксации), так и с большей способностью Магневиста проникать в интерстициальную жидкость.

Показано, что наиболее эффективным временем получения МР-томограмм тканей являются 10–20-е минуты после введения МРКС. В целом можно перечислить следующие основные фармакологические характеристики внеклеточных коммерческих МРКС:

— высокая степень безопасности;

— низкий коэффициент распределения между бутанолом и буферным раствором (низкая липофильность, т. е. высокая водная растворимость);

— незначительное связывание с белками плазмы крови (< 5 %);

— быстрое распределение между васкулярным и интерстициальным пространством с периодом полураспределения около 3–10 мин после внутривенного введения;

— преимущественно почечное выведение за счёт гломерулярной фильтрации (> 98 %);

— пролонгированное, но полное выведение при почечной недостаточности при показателе скорости гломерулярной фильтрации более 20 мл/мин;

— лёгкость выведения при гемодиализе;

— очень низкая внепочечная элиминация (< 2 %), в том числе с грудным молоком (< 0,05 %) [33];

— отсутствие энтерогепатической рециркуляции;

— медленная пассивная диффузия через большинство интактных гистогематических барьеров;

— отсутствие прохождения через интактные гематоэнцефалический и плацентарный барьеры;

— период полувыведения около 1,5–2 ч;

— эффективность контрастирования пропорциональна дозе;

— отсутствие биотрансформации при введении в организм.

В клинической практике наиболее широкое применение Магневист получил при исследовании центральной нервной системы, особенно для диагностики, а также дифференциальной диагностики опухолей головного и спинного мозга. Установлено, что при метастатическом поражении головного мозга введение Магневиста позволяет выявить дополнительные метастазы в 52 % случаев, получить дополнительную информацию при первичных опухолях головного мозга по критерию выявляемости

в 16% случаев, по критерию более точного определения объёма опухолевого поражения, выявления солидного и кистозного компонентов опухоли, сопутствующего отёка и очагов некроза — у 46% больных [9–45]. При опухолях спинного мозга дополнительная информация получена в 22% случаев. Вследствие различной степени повреждения гематоэнцефалического барьера во многих случаях удаётся провести дифференциальную диагностику между доброкачественными и злокачественными внутримозговыми и внемозговыми опухолями. Так, для доброкачественных глиом характерно почти полное отсутствие эффекта контрастного усиления после введения Магневиста. При анапластических астроцитомах и глиобластомах, как правило, наблюдается интенсивное гетерогенное усиление изображения опухоли, обусловленное, с одной стороны, нарушением гематоэнцефалического барьера, с другой — наличием в ней очагов некроза, не накапливающих контрастный препарат. Высокая эффективность применения Магневиста при метастатическом поражении головного мозга, главным образом, связана с возможностью выявлять мельчайшие (до 5 мм) очаги, в том числе расположенные субтенториально, визуализация которых без контрастного усиления или с помощью компьютерной томографии практически не возможна. При этом фактически во всех случаях удаётся изучить структуру и состояние контуров опухолевых узлов, а также ограничить их от зоны отёка. Для внемозговых опухолей, среди которых чаще всего встречаются менингиомы и невриномы, характерна высокая интенсивность контрастного усиления. При этом для менингиом конвекситальной поверхности, фалькса, а также мостомозжечковой области типично контрастирование прилежащей к опухоли твёрдой мозговой оболочки. Этот симптом имеет большое значение для дифференциальной диагностики менингиом.

По мере развития МР-техники и внедрения в практику ультраскоростных программ сканирования в нейрорадиологии и при исследовании внутренних органов широкое распространение получила динамическая контрастная МРТ с использованием болюсного введения Магневиста. При этом установлено, что с помощью данной методики могут быть получены ценные данные для дифференциации различных опухолей, а также определения степени их злокачественности. Так, оказалось, что в первую минуту после введения Магневиста менингиомы характеризуются более быстрым контрастированием, чем невриномы. Точно так же краниофарингиомы быстрее накапливают контрастный препарат, чем аденомы гипофиза. С другой стороны, отмечено, что скорость проникновения МРКС через повреждённый гематоэнцефалический барьер у больных с глиобластомой значительно выше, чем у пациентов с доброкачественной астроцитомой.

С помощью Магневиста удаётся более точно охарактеризовать менингиомы и невриномы с точки зрения анатомо-топографических взаимоотношений с окружающими тканями, особенно при больших размерах опухолей. Вместе с тем, обычно только после контрастного усиления выявляются небольшие невриномы VIII пары черепномозговых нервов, расположенные во внутреннем слуховом проходе.

При МРТ спинного мозга Магневист широко используется для диагностики и дифференциальной диагностики интра- и экстрамедуллярных опухолей, улучшения дифференциации границ и структуры новообразований, расположенных в позвоночном канале и экстравертебрально. Применение Магневиста позволяет уверенно отграничить солидный компонент новообразования от опухолевой кисты и сопутствующей сирингогидромиелии, что имеет большое значение для выбора места ламинэктомии. Кроме того, с помощью контрастного усиления, как правило, удаётся диагностировать распространение опухоли за пределы позвоночного канала («песочные часы»), а также метастазирование по субарахноидальным пространствам. Чрезвычайно ценные данные могут быть получены при введении Магневиста больным с рецидивами или продолженным ростом опухоли, когда на фоне послеоперационных

изменений рубцово-спаечного характера решить вопрос о наличии или отсутствии опухолевого поражения не представляется возможным.

В настоящее время Магневист успешно применяется не только при опухолевых поражениях, но также при некоторых других заболеваниях центральной нервной системы: аденомах гипофиза, рассеянном склерозе, артериовенозных мальформациях, васкулитах и др. При макроаденомах контрастное усиление позволяет составить более точное представление о взаимоотношениях аденомы с параселлярными структурами и внутренними сонными артериями, выявить инвазию кавернозного синуса. Повышение интенсивности сигнала в микроаденомах после введения Магневиста происходит медленнее, чем в неизменённых отделах гипофиза. Поэтому в первые 30–90 с (при динамическом контрастировании) микроаденомы отображаются в виде гипоинтенсивного очага значительно отчётливее, чем до контрастного усиления. Применение контрастного усиления при рассеянном склерозе в настоящее время входит во все протоколы обследования данной категории больных. Введение Магневиста по эффекту усиления бляшек позволяет уверенно говорить об активности патологического процесса, что имеет большое значение для коррекции проводимой терапии и оценки её эффективности. Ценная информация может быть получена при введении Магневиста больным с дегенеративным поражением позвоночника. Так, внезапно развившаяся дорзальная грыжа диска часто сопровождается эпидуритом, который обнаруживается по усилению интенсивности сигнала от прилегающих к ней тканей. После хирургических вмешательств нередко возникают проблемы при дифференциальной диагностике рецидива грыжи и изменений рубцово-спаечного характера. В этих условиях эффект усиления свидетельствует в пользу рубцового процесса, а при «краевом» усилении — в пользу сочетания грыжи с рубцовыми изменениями.

При злокачественных опухолях печени и её метастатическом поражении в большинстве случаев усиление интенсивности сигнала после введения Магневиста происходит в артериальную фазу с последующим вымыванием контрастного вещества в портальную и интерстициальную фазы, что свидетельствует о наличии гиперваскулярной опухоли. При гиповаскулярных образованиях начало усиления интенсивности сигнала наблюдается в портальную фазу. Эти данные полностью коррелируют с результатами дигитальной ангиографии, что свидетельствует об их достоверности. Для гемангиом характерным оказалось начало контрастирования в портальную или артериальную фазу с длительным сохранением усиления интенсивности сигнала и отсутствием эффекта вымывания.

Весьма перспективным оказалось применение Магневиста в диагностике инвазивного рака молочной железы [39]. Показано, что динамическая МРТ с контрастированием Магневистом является высокочувствительным методом диагностики рака, фиброаденом и кистозно-фиброзных мастопатий. Недавно опубликованы результаты фундаментального исследования, направленного на сопоставление данных контрастной T_1-взвешенной 3-мерной МР-визуализации (внутривенное болюсное введение Магневиста в дозе 0,2 ммоль/кг в течение 30 с с последующим введением 20 мл физиологического раствора) и данных оценки классических факторов диагноза и прогноза рака молочной железы (размер и морфология опухоли, гистология, состояние лимфатических сосудов, экспрессия эстрогенных рецепторов, онкобелка c-erbB-2, супрессора опухоли белка p-53 и маркёра пролиферации Ki-67) у 93 женщин с 114 онкологическими поражениями молочной железы. Оказалось, что имеет место сильная корреляция между контрастным усилением по периферии (вид кольца), скоростью достижения максимального контрастирования, скоростью его исчезновения и морфологическим (гистопатологические изменения), иммуно-гистохимическим (показатель Ki-67) и биохимическим (отрицательный статус эстрогенных рецепторов) параметрами. Проведённый корреляционный анализ позволил заключить, что динамическая

магнитно-резонансная визуализация (МРВ) с Магневистом позволяет не только дифференцировать доброкачественные опухоли молочной железы от злокачественных, но также делать вывод о степени злокачественности новообразования и прогнозировать его развитие. Иными словами, МРВ с контрастированием из дополнительно метода в маммологии превращается в один из самых информативных.

Другой перспективной областью применения МРВ как неинвазивного диагностического метода с Магневистом является магнитно-резонансная ангиография (МРА) — визуализация кровеносных сосудов [9, 18–20, 23, 24, 32, 46–48]. С его помощью без применения катетеров можно визуализировать сосуды практически всех анатомических областей и диагностировать такие заболевания сосудов, как сужения (стенозы), патологические расширения (аневризмы) или мальформации (шунты). Для проведения контрастной МРА Магневист (0,1–0,2 мл/кг) вводят внутривенно со скоростью 1–2 мл/с. При этом у больных с заболеваниями аорты контрастная МРА позволяет оценить максимальный диаметр аневризмы, степень пристеночного тромбирования, проксимальное распространение аневризмы и её соотношение с почечными артериями, распространённость зоны поражения на подвздошные артерии, а также состояние устьев почечных артерий. Кроме того, контрастная МРА даёт возможность определить протяжённость окклюзии сосуда, изучить сосудистую анатомию выше и ниже окклюзии, оценить коллатеральное кровообращение, неровности стенки сосуда. МРА с Магневистом при проведении вено-портографии позволяет одновременно визуализировать воротную вену, брюшную аорту и её ветви. Отсутствие артефактов, лучевой нагрузки и неинвазивность делают МРА с Магневистом методом выбора для диагностики поражений основного ствола и главных ветвей воротной вены, а также портальной гипертензии. Этот метод сегодня успешно конкурирует с классической рентгеновской ангиографией.

Магневист оказался весьма полезным в обнаружении инфарктов миокарда. В сравнении с традиционными методами, такими как рентгенография, КТ-сканирование или ультразвук, МРВ даёт возможность более точно выявить различия между теми или иными структурами миокарда.

На первых этапах развития МРВ сердца Магневист вводили в основном для получения информации о характере повреждений. Постепенно спектр показаний к использованию МРКС в кардиологии значительно расширился. Введение Магневиста сейчас необходимо для диагностики ишемической болезни сердца, миокардита, визуализации коронарных артерий и особенно шунтов с помощью МР-ангиографии. Последний метод все чаще используют при диагностике врождённой патологии.

Внедрение МРВ с контрастным усилением значительно увеличило качество диагностики острой и хронической ишемии миокарда. Сейчас существует 2 метода: определение перфузии и контрастное исследование в более поздние периоды после введения МРКС. Измерение перфузии при первичном прохождении болюса МРКС позволяет судить о миокардиальном кровотоке. Этот метод применяют преимущественно для первичного выявления заболевания коронарных артерий (ЗКА). Поскольку в состоянии покоя в большинстве случаев даже значительный стеноз не приводит к гипоперфузии, диагностику ЗКА следует проводить в условиях фармакологической нагрузки аденозином. Введение аденозина сопровождается расширением неизменённых коронарных артерий и приводит к гипоперфузии в области стенозированной коронарной артерии вследствие феномена «обкрадывания». Преимущество метода измерения перфузии заключается в том, что он позволяет судить о его гемодинамических последствиях стенозов. Кроме того, такое исследование может также включать регистрацию изображения в более поздние периоды после введения КС, позволяя выявлять «молчащие» инфаркты или определять размеры инфаркта.

МРВ с контрастным усилением можно использовать при инфаркте миокарда для определения точного размера инфаркта. Через 15 мин после введения МРКС контрастирование позволяет выявлять участки некроза и рубцовых изменений. Согласно экспериментальным исследованиям МРКС накапливаются именно в рубцовой ткани, образующейся после инфаркта. Причиной этого является изменение кинетики биотранспорта МРКС и увеличение внеклеточных пространств. Кроме выявления локализации и размеров патологии, МРВ также позволяет дифференцировать субэндокардиальный инфаркт от его трансмуральной формы. Региональные нарушения движения стенки часто развиваются вторично после инфаркта миокарда. Причиной этого может быть рубец, т. е. нежизнеспособный участок миокарда, или жизнеспособный, но не сокращающийся в данный момент. Два различных механизма могут принимать участие в последнем случае. Во-первых, жизнеспособный миокард с нарушенным движением стенки может быть хронически слабо перфузируемым; в этом участке клетки хоть и не погибли, сокращаться они не способны (состояние гибернации). Во-вторых, клетки могут находиться в состоянии длительного «оглушения» в течение до 4 недель после восстановления перфузии. Реваскуляризация путём расширения коронарных сосудов или операция шунтирования приводят к улучшению региональной, а значит и всей функции левого желудочка только в том случае, если ткань после реваскуляризации жизнеспособна. Целью диагностики жизнеспособности является предсказание возможности восстановления функции областей с нарушенной подвижностью стенки миокарда после реваскуляризации. Оценив степень трансмурального контрастирования в более поздние периоды времени, можно определить вероятность восстановления. Накопления контрастного средства тканью стенки миокарда на толщину, превышающую 50%, является критерием нежизнеспособности.

В то время как определение проходимости коронарных артерий для постановки диагноза стеноза при проведении диагностики ЗКА ещё не возможно с помощью МРВ, уже установлено, что последняя позволяет контролировать лечебный эффект интервенционных мероприятий или шунтирования коронарных артерий. МР-ангиография с контрастным усилением даёт возможность определить проходимость шунтированных сосудов сердца с точностью 95%. Даже если не удаётся надёжно определить стенозирование шунта, данный метод позволяет оценить функциональную способность шунта при его комбинации с исследованием перфузии миокарда.

МРВ сердца играет всё большую роль при диагностике врождённой патологии, а также находит широкое применение для послеоперационного мониторинга лечения у взрослых, когда качество эхокардиографической визуализации становится ограниченным в условиях улучшения терапевтических возможностей. В этих случаях МРВ позволяет получать как информацию, соответствующую той, что даёт прямая ангиография, так и оценивать функциональную способность и количественно определять степень повреждений в сердце с помощью измерения тока крови.

Более полную информацию о различных аспектах клинического применения Магневиста можно найти в 4-м издании монографии «Магневист» (R. Felix и др.), изданной в 2001 г. [16]. В ней, в частности, приведены подробные сведения о клиническом опыте применения Магневиста для диагностики новообразований различной локализации, заболеваний головного мозга, включая перфузионные исследования, спинного мозга, позвоночника, шеи и лица, органов грудной клетки, сердца, печени, поджелудочной железы, прямой кишки, почек и надпочечников, мочевого пузыря, брюшной полости, матки, простаты, опорно-двигательного аппарата, костного мозга, суставов, а также для проведения трёхмерной МР-ангиографии артерий всего тела и при интервенционных мероприятиях.

Магневист отличается очень хорошей переносимостью, в том числе у детей грудного возраста, и только в редких случаях может вызвать местные или общие побочные явления (обычно в лёгкой форме).

Диагностическая доза Магневиста намного ниже, чем рентгеноконтрастных веществ, что особенно важно для больных с нефропатиями, так как в этом случае Магневист не влияет на функциональную активность почек, может наблюдаться лишь замедление его выведения с мочой. Частота побочных реакций Магневиста значительно ниже, чем рентгеноконтрастных средств

Магневист стал не только первым МРКС, но и первым средством, разрешённым для применения у детей любого возраста, для проведения МР-ангиографии и других методов МРВ. Однако развитие в последние годы самого метода МРТ и создание сверхбыстрых компьютеров способствовало интенсификации новых типов МРКС, например высококонцентрированных и органотропных. В соответствии с развитием МР-технологий, требующих введения больших доз МРКС, был создан первый в мире 1 молярный препарат Гадовист 1,0.

Преимущества одномолярного МРКС. Гадобутрол очень хорошо растворяется в воде и имеет чрезвычайно высокую гидрофильность (коэффициент его распределения между *н*-бутанолом и буфером с pH 7,6 равен приблизительно 0,006). Макроциклический лиганд с парамагнитным ионом гадолиния образует прочный комплекс, характеризующейся исключительно высокой стабильностью как *in vivo*, так и *in vitro* [17].

В табл. 15.13 приведены физико-химические свойства раствора Гадовиста (1,0 ммоль/мл).

Таблица 15.13

Физико-химические свойства раствора Гадовиста (1,0 ммоль/мл)

Осмолярность при 37 °С, мОсм/л раствора	1117
Осмоляльность при 37 °С, мОсм/кг воды	1603
Вязкость при 37 °С, мПа · с	4,96

Один миллилитр раствора Гадовиста для инъекций содержит в качестве активного ингредиента 604,72 мг гадобутрола (что эквивалентно 1,0 ммоль). В качестве неактивных компонентов в состав Гадовиста 1,0 входят калькобутрол натрия, трометамол, 1 Н соляная кислота, вода для инъекций.

Повышение контрастности при проведении МРТ с помощью Гадовиста 1,0 обусловлено его активным компонентом гадобутролом, который представляет собой нейтральный комплекс гадолиния (III) с макроциклическим лигандом — дигидроксигидроксиметилпропилтетраазациклододекантриуксусной кислотой (бутролом).

Индукция локальных колебаний магнитного поля под влиянием сильного магнитного момента гадолиния при T_2^*-взвешенных импульсных последовательностях приводит к изменению сигнала от тканей (контрастирующему эффекту).

Гадобутрол даже в невысоких концентрациях вызывает значительное сокращение времени релаксации. Количественно способность изменять времена релаксации T_1 и T_2, определяемая по влиянию на время спин-решёточной и спин-спиновой релаксации протонов в плазме при pH 7 и 40 °С, составляет примерно 5,6 л/(ммоль · с) и 6,5 л/(ммоль · с) соответственно. Способность влиять на времена релаксации лишь в небольшой степени зависит от напряжённости магнитного поля.

Введение Гадовиста позволяет получить более точную диагностическую информацию по сравнению с данными при обычной МРТ, в областях с высокой прони-

цаемостью гематоэнцефалического барьера или с его отсутствием, что обусловливает нарушение перфузии или увеличение объёма внеклеточного пространства, например в случаях первичных или вторичных опухолей, воспалительных и демиелинизирующих заболеваний. Поведение гадобутрола в организме сходно с поведением других высокогидрофильных биологически инертных веществ, выделяемых почками (например, маннитола или инулина). Введённый внутривенно гадобутрол быстро распределяется во внеклеточном пространстве и в неизменённой форме выводится почками путём клубочковой фильтрации. Экстраренальная элиминация пренебрежимо мала.

Показатели фармакокинетики у человека пропорциональны вводимой дозе гадобутрола. Если доза гадобутрола не превышает 0,4 ммоль на 1 кг массы тела, после начальной фазы распределения наступает фаза элиминации и его уровень в плазме уменьшается с периодом полужизни 1,81 ч (1,33–2,13 ч), что соответствует скорости выведения почками. При дозе гадобутрола 0,1 ммоль/кг веса тела через 2 мин после инъекции его уровень в плазме составлял 0,59 ммоль/л, а через 60 мин после инъекции — 0,3 ммоль/л. В течение двух часов с мочой выводится более 50% введённой дозы, а в течение 12 ч — более 90%. Если введённая доза гадобутрола равна 0,1 ммоль/кг массы тела, то 100,3 ± 2,6% этой дозы выводится из организма за 72 ч. Почечный клиренс гадобутрола у здоровых лиц составляет от 1,1 до 1,7 мл · мин$^{-1}$ · кг$^{-1}$; таким образом, он сравним с клиренсом инулина, что свидетельствует о преимущественном выведении гадобутрола путём клубочковой фильтрации. Менее 0,1% введённого вещества выводится из организма с калом. Никаких метаболитов в плазме и моче обнаружить не удалось.

Период полупревращения Гадовиста у больных с нарушенной функцией почек увеличивается пропорционально степени снижения клубочковой фильтрации. У больных с лёгким или умеренным нарушением функции почек Гадовист полностью выводится с мочой в течение 72 ч. У больных с тяжёлым нарушением почечной функции по меньшей мере 80% введённой дозы выводится с мочой в течение 120 ч. Если почечная функция резко снижена, может возникнуть необходимость проведения гемодиализа.

Гадовист применяют для повышения контрастности при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) области головы и позвоночника (краниальной и спинальной томографии).

К числу специальных показаний к спинальной МРТ относятся: проведение дифференциального диагноза между интра- и экстрамедуллярными опухолями, выявление границ солидных опухолей в спинномозговом канале и определение распространённости интрамедуллярной опухоли.

Раствор Гадовиста обладает особыми преимуществами при наличии показаний к применению магнитно-резонансных контрастных средств в высоких дозах, например в случаях, когда выявление или исключение дополнительных очагов поражения может повлиять на проводимое лечение или врачебную тактику, а также при выявлении мелких повреждений и для визуализации поражений, трудно контрастируемых обычными средствами.

Раствор Гадовиста (1,0 ммоль/мл) пригоден также для перфузионных исследований: при диагностике инсульта, распознавании очаговой ишемии мозга и оценки кровоснабжения опухоли. Необходимую дозу Гадовиста вводят внутривенно в виде болюса. Проведение магнитно-резонансной томографии с повышенной контрастностью можно начинать сразу (вскоре после инъекции в зависимости от применяемой импульсной последовательности и схемы исследования). Оптимальное контрастирование обычно наблюдается примерно в течение 15 мин после введения Гадовиста (это время зависит от особенностей повреждения и характера ткани). Обычно повышенная контрастность сохраняется до 45 мин после введения Гадовиста.

При использовании всех МРТ-контрастных средств могут наблюдаться такие побочные эффекты как тошнота и рвота. Поэтому, чтобы свести к минимуму риск рвоты и возможной аспирации, больной должен воздерживаться от приёма пищи в течение двух часов до исследования.

Внутривенное введение контрастных средств по возможности следует производить больному, находящемуся в положении лёжа на спине. После введения Гадовиста больной должен оставаться под врачебным наблюдением как минимум 30 мин, поскольку, как показывает опыт использования контрастных средств, большинство нежелательных побочных явлений наблюдается в этот период.

Для исследований с повышенной контрастностью наиболее пригодны при сканировании T_1-взвешенные импульсные последовательности. Для перфузионных исследований головного мозга рекомендуют применять T_2-взвешенные импульсные последовательности.

Набирать Гадовист 1,0 в обычный шприц следует только непосредственно перед проведением исследования. Любое контрастное вещество, не использованное в ходе одного исследования, должно быть выброшено.

При проведении МРТ области головы и позвоночника (краниальная и спинальная томография) раствор Гадовиста (1 ммоль/мл) вводят в дозе 1,0 мл на 1 кг массы тела (что эквивалентно 0,1 ммоль/кг массы тела), что обычно достаточно, чтобы получить ответы на клинические вопросы.

Если, несмотря на нормальную МР-томограмму с повышенной контрастностью, остаются подозрения о наличии поражений или если необходима более точная информация о числе, размере и распространённости поражений для выработки врачебной тактики и лечения, то диагностическую эффективность исследования можно повысить, дополнительно введя раствор Гадовиста (0,1 ммоль/мл) в дозе 0,1 или даже 0,2 мл на 1 кг массы тела в течение 30 мин после предыдущей инъекции.

Чтобы исключить метастазы или рецидив опухоли, вводят раствор Гадовиста (0,1 ммоль/мл) в дозе 0,3 мл на 1 кг массы тела, что часто способствует повышению диагностической эффективности исследования. Это относится к поражениям со слабой выраженностью сети кровеносных сосудов, с малым внеклеточным пространством или сочетанием этих факторов, а также к использованию при сканировании относительно менее интенсивных T_1-взвешенных импульсных последовательностей.

Для перфузионных исследований головного мозга рекомендуется применять T_2-взвешенные импульсные последовательности в комбинации с МРТ головного и спинного мозга для выявления объёмных поражений или локальной ишемии при отсутствии предположений об объёмных поражениях.

Для проведения данного исследования рекомендуется использовать инжектор; раствор Гадовиста (0,1 ммоль/мл) вводят в дозе 0,3 мл на 1 кг массы тела со скоростью 3–5 мл/с. Больные хорошо переносили максимальную ежедневную дозу раствора Гадовиста (1 ммоль/мл), проверенную в клинических испытаниях — 0,5 мл на 1 кг массы тела. При почечной недостаточности доза раствора Гадовиста (1 ммоль/мл) должна быть не выше 0,1 мл на 1 кг массы тела.

При использовании гадолинийсодержащих магнитно-резонансных контрастных средств сообщалось о возникновении в ряде случаев анафилактоидных реакций; подобные реакции нельзя априорно исключить и для Гадовиста. Поэтому решение о применении Гадовиста больным с предрасположенностью к аллергии должно быть особенно тщательно взвешенным: необходимо учитывать отношение риск/польза. Как и для других контрастных средств, возможно возникновение отсроченных реакций (через несколько часов или суток после введения). При проведении исследования должны быть непосредственно доступны необходимые лекарственные средства и оборудование (например, интубационная трубка и кислород для искусственной

вентиляции лёгких). До настоящего времени никаких нарушений функции почек после применения Гадовиста отмечено не было.

Отношение риск/польза следует с особой тщательностью оценивать у больных с тяжёлыми нарушениями функции почек, поскольку в подобных случаях выведение контрастного вещества замедлено. В особо тяжёлых случаях следует удалить Гадовист из организма с помощью гемодиализа. После трёх курсов диализа из организма выводится примерно 98% этого контрастного средства.

Так же тщательно следует оценивать отношение риск/польза, решая вопрос о применении Гадовиста больным с тяжёлыми сердечно-сосудистыми заболеваниями, хотя соответствующая информация пока носит весьма ограниченный характер. Гадовист, подобно другим контрастным средствам, содержащим хелат гадолиния, требует особых предосторожностей при назначении больным с низким порогом судорожной активности.

Выраженные состояния возбуждения, беспокойства и боли могут повысить риск побочных явлений или усилить побочные реакции, обусловленные введением контрастного средства.

Поскольку данные о применении гадобутрола при беременности отсутствуют Гадовист не следует вводить беременным женщинам, если только это не диктуется очевидной необходимостью. В экспериментах на животных не было выявлено ни эмбриотоксического, ни тератогенного действия диагностических доз Гадовиста.

До настоящего времени не изучена возможность попадания гадобутрола в молоко кормящей женщины. Однако, как показывают эксперименты на животных, Гадовист в минимальных количествах (менее 0,01% введённой дозы) попадает в грудное молоко. Поэтому после введения Гадовиста кормление грудью должно быть прервано, по меньшей мере на 24 ч.

Реакции гиперчувствительности на введение Гадовиста чаще развиваются у больных, предрасположенных к аллергии, чем у других больных. В редких случаях анафилактоидные реакции сопровождаются нарушениями дыхания и другими симптомами, достигающими степени анафилактического шока.

Результаты клинических испытаний свидетельствуют об отсутствии отрицательного влияния Гадовиста на общее самочувствие, а также на функции печени, почек и сердечно-сосудистой системы. До настоящего времени не было отмечено случаев интоксикации, связанной с передозировкой Гадовиста при его клиническом применении. На основе результатов исследований острой токсичности риск возникновения острой интоксикации в связи с применением Гадовиста крайне маловероятен. В случаях непреднамеренной передозировки Гадовист может быть выведен из организма с помощью экстракорпорального диализа.

Двукратное увеличение концентрации гадолиния в растворах магнитно-резонансных контрастных средств даёт значительные преимущества.

Внедрение магнитно-резонансной визуализации (МРВ) с контрастным усилением в 1988 г. в клиническую практику значительно улучшило качество диагностики заболеваний внутренних органов. Первые внеклеточные МРКС, созданные на основе гадолиния, с концентрацией 0,5 моль/л и сейчас с успехом применяются во многих областях МРВ. Однако создание магнитно-резонансных томографов с более сильными и более быстрыми градиентами магнитнрого поля, позволяющие использовать последовательности импульсов с лучшим временным и пространственным разрешением, способствовало поиску в последние несколько лет новых классов МРКС со специальными свойствами. Оказалось, что высококонцентрированные МРКС в сочетании со сверхбыстрыми импульсными последовательностями дают возможность в реальном времени определять малейшие изменения кровотока в любом участке организма человека, а также выявлять небольшие функциональные и органические

нарушения в головном и спинном мозге. В соответствии с возникшими потребностями учёным удалось сразу в 2 раза увеличить концентрацию гадолиния в растворе МРКС, создав одномолярный препарат, названный Гадовистом 1,0. Не случайно, что его разработчиком стал признанный мировой лидер в области лучевой диагностики концерн Шеринг АГ (Германия), создавший и внедривший в клинику не только первые МРКС, но и первые йодсодержащие органические рентгеноконтрастные и первые ультразвуковые контрастные средства.

Гадовист 1,0 содержит в качестве активной субстанции гадобутрол в концентрации 1,0 моль/л, что соответствует двукратному повышению количества гадолиния в единице объёма по сравнению с другими современными гадолинийсодержащими контрастными средствами в концентрации 0,5 моль/л. Кроме того, гадобутролу присуща большая способность ускорять релаксацию T_1 по сравнению с другими существующими внеклеточными МРКС на 14–27% (табл. 15.14).

Таблица 15.14

Сравнение физико-химических и биохимических свойств современных внеклеточных МРКС

Свойство	Магневист, 0,5 моль/л	Дотарем, 0,5 моль/л	Омнискан, 0,5 моль/л	Гадовист, 0,5 моль/л	Гадовист, 1,0 моль/л
Термодинамическая стабильность ($\log K$)	22,1	25,8	16,9	21,8	21,8
Концентрация дополнительного комплексирующего лиганда, мол.%	0,2	0,25	5,0	0,1	0,1
T_1-релаксационная активность в плазме, 0,47 Т, $мМ^{-1} \cdot с^{-1}$	4,8	4,3	4,4	5,6	5.6
Вязкость, мПа · с, при 37 °С	2,9	2,0	1,4	1,4	4,96
Осмоляльность, осмоль/кг H_2O, при 37 °С	1,960	1,350	0,798	0,557	1,60
Связывание с белками	1		2,1	2,7	2,7
Высвобождение гистамина I_{50}, ммоль/л	140	110	110	> 250	> 250

Уникальность молекулы гадобутрола как нейтральной молекулы, в которой положительный заряд гадолиния сбалансирован отрицательным зарядом трёх внутренних карбоксильных групп, состоит в том, что несмотря на двойную концентрацию Гадовист 1,0 имеет значения осмоляльности и вязкости, которые находятся в пределах, соответствующих хорошей переносимости для внутривенных контрастных средств. Растворы других МРКС при таких концентрациях имеют более высокие значения этих параметров, при которых инъекция становится технически невозможной, или их вообще нельзя приготовить в концентрации 1 моль/л. В два раза большая концентрация гадолиния у Гадовиста 1,0 по сравнению с обычными МРКС создаёт особые преимущества, наиболее сильно проявляющиеся в отношении геометрии болюса.

Дело в том, что компактный высоко концентрированный болюс необходим для получения изображения перфузии головного мозга при первичном прохождении, для выявления очагов ишемии — метода, который представляется исключительно

важным в контексте изменений подхода к ишемическому инсульту как заболеванию, требующему проведения экстренных медицинских мероприятий. При получении перфузионного изображения — МР-исследования с первичным пассажем — качество изображения сильно зависит от геометрии и компактности болюса контрастного средства, которые стали оптимальными после удвоения концентрации вводимого раствора контрастного средства [13]. Кроме того, двукратная концентрация более удобна для ручного введения при введении больших доз контрастного средства.

Гадовист 1,0 позволяет:

— получать оптимальную геометрию болюса;

— облегчать введение препарата;

— добиваться наилучшей безопасности и эффективности при краниальной, спинальной МРВ и МР-ангиографии.

В результате создания Гадовиста 1,0, клиницисты получили возможность использовать специальное МРКС, имеющее выраженные преимущества при следующих технологиях МР-диагностики:

— визуализации при перфузионных исследованиях;

— исследованиях с применением высоких доз;

— МР-ангиографии.

Визуализация ЦНС составляет около 2/3 всех МРВ-исследований и остаётся основной областью применения МРВ в клинике. Использование парамагнитных контрастных средств значительно улучшает разрешение получаемого изображения, повышая эффективность диагностики таких поражений, как первичные опухоли, метастазы или очаги инфекций, инсульт и старческое слабоумие, что облегчает определение правильного пути лечения. В ходе проведения III фазы клинических исследований с участием 295 пациентов из 13 клинических центров была оценена способность Гадовиста 1,0 диагностировать различные поражения головного мозга [30]. Результаты исследований, полученных на определённых подгруппах этих центров, были опубликованы отдельно и затем были использованы для сравнения в последующих испытаниях.

Гадовист 1,0 вводили по схеме с дополнительными дозами: первая инъекция составила 0,1 ммоль/кг массы тела, вторая через 20 мин — 0,2 ммоль/кг массы тела. Общая доза — 0,3 ммоль/кг массы тела.

В целом улучшение диагностической эффективности по сравнению со сканированием без контрастирования после введения первой (стандартной) дозы имело место в 95% случаев; степень данного улучшения от «хорошего до отличного» была в 61% случаев (у 177 пациентов из 291). После второй инъекции через 20 мин после первой (общая доза 0,3 ммоль/кг массы тела) достоверность диагностики ещё более повысилась в 49% случаев (у 141 пациента из 285). На основании этих результатов были сделаны уточнения показаний к применению Гадовиста 1,0.

После первой инъекции дополнительная диагностическая информация была получена у 252 из 291 пациента (87%). После второй инъекции по сравнению со стандартной дозой дополнительную информацию удалось получить у 129 из 285 пациентов (45%).

При заболеваниях сосудов головного мозга детальная информация о перфузии сосудистого русла в области головного мозга имеет критически важное значение для постановки экстренного диагноза ишемического инсульта, а также для выбора последующей терапии и прогноза. Кроме того, визуализации перфузии может помочь диагностировать опухоли головного мозга благодаря визуализации характера васкуляризации ткани.

Возможность оценки перфузии головного мозга основана на способности гадолинийсодержащих МРКС, после их быстрого внутривенного болюсного введения,

уменьшать времена релаксации T_2 и T_2^* при первичном прохождении. Используя быстрые МР-технологии получения изображения, при наличии достаточно высокой концентрации гадолиния в кровотоке, можно определить такие параметры, как объём относительного регионального кровотока (rrCBV), скорость относительного регионального кровотока (rrCBF), величину транзитного времени и другие функциональные параметры. Степень изменения интенсивности сигнала в области интереса (ROI) определяется T_2^*-чувствительностью импульсной последовательности, дозой и магнитными свойствами МРКС, скоростью инъекции и концентрацией гадолиния, а также физиологическими параметрами — статусом перфузии, сердечным выбросом, гематокритом, оксигенацией, размером и архитектоникой сосудистого компартмента. Согласно теоретическим и экспериментальным данным величина изменения интенсивности сигнала при динамической МР-визуализации непосредственно связана с истинной концентрацией контрастного вещества в каждом вокселе сосудистого русла, поэтому небольшой по размерам болюс с высокой концентрацией контрастного средства необходим для получения визуализации перфузии головного мозга. Таким образом, концентрация контрастного вещества в вокселе во времени играет основную роль в изменении интенсивности сигнала и, следовательно, в точности диагностики гемодинамических нарушений в головном мозге.

При ишемическом инсульте магнитно-резонансная визуализация при первичном пассаже после введения болюса внеклеточного контрастного средства позволяет выявить локализацию областей с гипоперфузией. Более того, использование контрастных средств с низкой молекулярной массой типа Гадовиста 1,0 представляет собой метод выбора для идентификации остаточного коллатерального тока плазмы [11]. Такой коллатеральный ток через капилляры можно использовать для доставки нейропротекторорных средств к недоступным участкам инфаркта мозга. В настоящее время ведётся разработка лекарственных средств, способных спасти ткань мозга, в которой развивается гипоксия вследствие снижения кровотока.

В общем случае визуализация перфузии головного мозга при первичном прохождении отражает относительный объёмный кровоток головного мозга (rrCBV) в области интереса (ROI). Кроме того, можно количественно оценить абсолютный объёмный кровоток и ток крови в головном мозге, определив все основные факторы, такие как скорость и геометрию контрастного болюса.

Предпосылкой получения диагностически значимых результатов при использовании метода перфузии является качество болюса контрастного средства. Препараты с концентрацией гадолиния, равной 1,0 ммоль/л, такие как Гадовист 1,0 после внутривенного болюсного введения позволяют получать превосходную геометрию болюса по сравнению с обычными МРКС с концентрацией 0,5 моль/л. В экспериментах на животных было показано, что введение Гадовиста 1,0 в дозе 0,3–0,4 ммоль/кг при использовании T_2^*-взвешенных импульсных последовательностей позволяет значительно увеличить чувствительность метода визуализации перфузии головного мозга, повышая разницу между ишемизированным и неишемизированным участками головного мозга. Было установлено, что концентрация гадолиния в общей сонной артерии после введения гадобутрола (1,0 моль/л) на 30% выше, чем после введения гадобутрола (0,5 моль/л) в одной и той же дозе — 0,3 ммоль/кг.

При проведении аналогичных внутрииндивидуальных контролируемых рандомизированных исследований у здоровых добровольцев также были получены данные, свидетельствующие о значительных преимуществах концентрации гадобутрола 1,0 моль/л по сравнению с его концентрацией 0,5 моль/л. Эти преимущества выражаются в большей контрастности белого вещества по отношению к серому и статистически значимому увеличению максимального изменения скорости поперечной релаксации и величины сигнала в сером веществе головного мозга на 30–40%.

Для карты rrCBF высокие значения транзиторной концентрации МРКС при первом прохождении имеют большую роль, чем для карты rrCBV.

В экспериментах на крысах оценивали влияние концентрации гадобутрола на эффективность визуализации перфузии головного мозга при использовании T_2-взвешенной FLASH-последовательности. Было показано, что в дозе 0,3 ммоль/кг массы тела Гадовист 1,0 увеличивает падение сигнала на 15–20% сильнее, чем гадобутрол в концентрации 0,5 ммоль/л. Снижение интенсивности сигнала было статистически достоверным ($p < 0{,}05$ для увеличения на 15% и $p < 0{,}001$ для увеличения на 20%). Ишемизированные участки лучше отделены на картах визуализации от перфузируемой ткани при использовании 1,0 моль/л концентрации в дозе 0,3 ммоль/кг массы тела. Доза 0,1 ммоль/кг массы тела при использовании растворов любой концентрации не позволяет получить удовлетворительную диагностическую информацию.

При изучении перфузии головного мозга с помощью МРВ у 40 больных с односторонним церебральным инфарктом или стенозом сонных артерий Гадовист 1,0 вызывал максимальное снижение сигнала (МСС) на 36% при использовании дозы 0,4 ммоль/кг массы тела и последовательности GRE. В другом исследовании на 30 больных, проведённых по собственной инициативе центра, Магневист в тройной дозе давал МСС не выше 25%. Принимая во внимание, что для убедительного выявления различий в перфузии необходима величина МСС около 30%, Гадовист 1,0 позволяет более надёжно определить характеристики сосудов головного мозга.

При исследовании дозовой зависимости у 89 пациентов с односторонним ишемическим инфарктом и/или односторонним стенозом сонных артерий обнаружено, что Гадовист 1,0 в такой маленькой дозе как 0,3 ммоль/кг массы тела, в сочетании с последовательностью GRE позволяет получать удовлетворительную для постановки диагноза информацию при визуализации перфузии головного мозга. При проведении исследований на сканерах с 1,0 Т и использовании T_2-взвешенной FLASCH-последовательности Гадовист 1,0 вводили со скоростью 5 мл/с. Результаты диагностики показали, что качество болюса улучшается дозозависимым образом.

Перфузионная МРВ с Гадовистом 1,0 сравнивали со SPECT в отношении их способности определить гипоперфузионные области головного мозга в подгруппе 44 больных. Несмотря на ограничения, связанные с пространственным разрешением, SPECT на стоящее время представляет собой единственный рутинный метод, который используют для оценки характера перфузии головного мозга и с которым сравнивают новые методические подходы.

Гадовист 1,0 вводили в дозе 0,3 ммоль/кг массы тела, а SPECT проводили с помощью Нейролита. Гадовист 1,0 был по крайней мере таким же эффективным, как SPECT, при выявлении ишемии или инфаркта, но, возможно, имел преимущества при выявлении инфарктов небольшого размера. Кроме того, магнитно-резонансная визуализации перфузии позволяла получать более точную информацию об анатомии и была единственным методом, способным визуализировать феномен избыточной перфузии, помогая таким образом определить характер лечения и контролировать его результаты.

Эти результаты свидетельствуют о том, что двойная концентрация гадолиния в Гадовисте 1,0 по сравнению с МРКС меньшей концентрации и альтернативными диагностическими методами даёт существенные преимущества в визуализации перфузии головного мозга.

Большинство поражений ЦНС можно выявить при использовании стандартной дозы 0,1 ммоль/кг массы тела МРКС. Однако в ряде случае дозы гадолиния до 0,3 ммоль/кг дают преимущества, например для идентификации очагов маленьких размеров или исключения дополнительных патологических изменений. Возможность исключить дополнительные поражения головного мозга имеет очень важное практи-

ческое значение, в особенности при выборе способа лечения между хирургическим вмешательством и радиотерапией. В описываемом многоцентровом исследовании была выделена подгруппа из 30 больных с различными первичными опухолями головного мозга. Однократная доза 0,1 ммоль/кг массы тела была достаточной для постановки дифференциального диагноза первичной опухоли головного мозга. В другой подгруппе из 30 больных с гистологически подтверждёнными астроцитомами и менингиомами после введения стандартной дозы Гадовиста 1,0 средняя величина повышения контрастности опухоль — белое вещество увеличивалась с 0,90 (нативное сканирование) до 1,38 (Гадовист 1,0 в дозе 0,1 ммоль/кг массы тела).

Дальнейшее улучшение качества контрастирования имело место после введения дополнительной дозы Гадовиста 1,0 (0,2 ммоль/кг, общая доза 0,3 ммоль/кг массы тела). Тройная доза статистически значимо ($p < 0{,}001$) увеличивала среднюю величину контрастности между опухолью и белым веществом с 1,38 (однократная доза) до 1,79.

В третьей подгруппе (однократная и повторная инъекции у 131 и 128 пациентов соответственно) при исследовании первичных опухолей достоверность диагностики повышалась в 97% случаев после первой инъекции Гадовиста 1,0 (127 пациентов из 131) со степенью улучшения в целом от хорошей до отличной в 71% случаев. Обычно границы размеров опухоли определялись более чётко только после введения большой дозы.

Введение второй дозы (0,2 ммоль/кг массы тела) улучшало достоверность диагностики у 39% пациентов по сравнению с первой инъекцией, а повышение степени улучшения диагностической эффективности от хорошей до отличной имело место у 28% от всех пациентов. Все исследования начинали сразу же после завершения введения контрастного средства.

При проведении уже упомянутого многоцентрового исследования у 44 пациентов диагностировали метастазы в головном мозге. Первая инъекция Гадовиста 1,0 (0,1 ммоль/кг массы тела) улучшала диагностическую эффективность у всех обследованных пациентов со степенью улучшения от хорошего до отличного в 78% случаев. Вторая инъекция (0,2 ммоль/кг) ещё более увеличивала достоверность диагностики в 71% случаев.

Превосходные результаты были получены при использовании высокой дозы (0,3 ммоль/кг массы тела), при этом отмечалось, что постановка однозначного диагноза имеет первостепенное значение у больных с метастазами.

Тройная доза Гадовиста 1,0 статистически достоверно увеличивает контрастность изображения метастазов по сравнению с однократной дозой, что особенно важно в случаях, требующих исключения дополнительных метастазов. Два метастаза, которые не были выявлены с помощью стандартной дозы, были идентифицированы при использовании тройной дозы. Этот факт подтверждён в публикации, где описаны результаты диагностики у 30 больных: тройная доза позволила получить более точные результаты, особенно в случае исключения множественных поражений.

Использование контрастного средства в более высокой концентрации гадолиния заметно облегчает ручное введение высоких доз. При введении тройной дозы при исследовании метастазов требуется, например, всего 21 мл Гадовиста 1,0 у больного с массой 70 кг.

В настоящее время МРВ стал ценным методом для диагностики рассеянного склероза. В этом случае МРВ позволяет не только диагностировать заболевание, но и провести отбор больных для последующего лечения в контексте целесообразности применения новых терапевтических подходов, которые недавно появились благодаря такому препарату, как интерферон-β-1б (Бетаферон) [1].

При рассеянном склерозе (РС) МРВ вносит существенный вклад в оценку стадии заболевания и его прогрессирование путём выявления контрастируемых и неконтрастируемых поражений одновременно.

В связи с появлением новых терапевтических возможностей (таких как препарат интерферон-β-1б — Бетаферон) возникла необходимость разработки методов, позволяющих более точно отбирать больных, а также контролировать процесс лечения.

По современным представлениям T_2-взвешенная МРВ — это наиболее чувствительный тест, позволяющий определить распространённость заболевания, но имеющий ограниченную специфичность. T_1-взвешенная визуализация с контрастированием гадолинием увеличивает специфичность, позволяя проводить дифференциальный диагноз между контрастируемыми и некотрастируемыми поражениями. Контрастируемые поражения при T_1-взвешенной визуализации относятся к «активным» поражениям, сопровождающимся нарушением гематоэнцефалического барьера, вызванным воспалением, и свидетельствуют об обострении РС. В то же время неконтрастируемые поражения относятся к ранее возникшим очагам заболевания. При одновременном использовании двух методов визуализации специфичность МРВ можно увеличить до 80%.

В ранее упомянутом многоцентровом исследовании III фазы была сформирована специальная группа из 81 больного с диагнозом рассеянный склероз, поставленным без контрастирования. В этом случае достоверность диагноза повысилась после первой инъекции Гадовиста 1,0 у 90% пациентов со степенью улучшения от хорошей до отличной в 38% случаев. После введения второй инъекции (общая доза 0,3 ммоль/кг массы тела) достоверность увеличилась дополнительно у 65% больных. При этой дозе степень улучшения от хорошей до отличной составила 48% случаев.

Результаты, полученные после первой инъекции, потребовали изменения лечения у 21 больного (26%). В то время как стандартная доза позволила выявить дополнительные поражения у 9 пациентов (11%), высокая доза дала возможность визуализировать дополнительные поражения у 31 больного (39%). Таким образом, у больных рассеянным склерозом, особенно при отсутствии выраженных клинических симптомов, представляется целесообразным сразу же использовать высокую дозу.

Начиная с 1993 г., когда впервые была описана трёхмерная МРА с контрастированием, МРКС всё шире применяют для повышения контрастности изображения сосудов относительно окружающих тканей и устранения артефактов кровотока сосудов по отношению к фоновому отношению сигнал/шум. Однако применявшиеся ранее 0,5-молярные МРКС не позволяют контрастировать мелкие сосуды и проводить быструю трёхмерную МРА. В то же время 1,0-молярный препарат Гадовист 1,0 в сочетании со сверхкороткими импульсными последовательностями градиентного эха позволяет проводить всесторонний анализ состояния артерий и вен практически всего тела [2, 12–15, 21, 22, 29, 31, 34–38]. В настоящее время в странах Европейского Союза официально подтверждено показание использования Гадовиста 1,0 для целей МР-ангиографии. Для визуализации одной области у человека с массой тела выше 75 кг рекомендована доза Гадовиста 1,0, равная 10 мл, а для визуализации более чем одной области — 20 мл. При сравнении контрастирующей способности Гадовиста 1,0 (8 мл) с 0,5-молярным Магневистом (16 мл) у больного с клиническими признаками периферической ангиопатии была продемонстрирована более высокая возможность визуализации дистального сегмента внутренней подвздошной артерии при использовании Гадовиста 1,0, которая была необходима для постановки достоверного диагноза. Относительно небольшой объём болюса Гадовиста 1,0, благодаря повышенной концентрации гадолиния, обеспечивает однородность контрастирования и позволяет оценить состояние мелких сосудов, визуализация которых ранее была невозможна. Таким образом, для быстрой и точной оценки состояния сосудов всего

организма при проведении трёхмерной МР-ангиографии препаратом выбора является Гадовист 1,0.

Как известно, применяемые 0,5-молярные МРКС характеризуются хорошим профилем переносимости и в несколько раз реже вызывают побочные реакции, чем йодсодержащие рентгеноконтрастные средства. Получив новый препарат с двукратной концентрацией гадолиния Гадовист 1,0, клиницисты естественно должны быть уверены, что наряду с повышенной диагностической способностью он должен соответствовать современным требованиям, предъявляемым к диагностическим средствам в отношении безопасности. Поэтому перед внедрением Гадовиста 1,0 в клинику он был подвергнут всесторонним доклиническим испытаниям. При изучении острой внутривенной токсичности гадобутрол вводили самцам и самкам мышей со скоростью 2 мл/мин в дозе 15, 20 и 25 ммоль/кг (восемь животных в каждой группе). В группе животных, которым вводили препарат в дозе 15 ммоль/кг, смертных случаев не было, а в группе, где его вводили в дозе 20 ммоль/кг, погибло только одно животное.

Рассчитанная величина LD_{50} составила 23 ммоль/кг с доверительным уровнем достоверности 95% для пределов от 20 до 27 ммоль/кг [21]. Результаты сравнения острой токсичности макроциклических МРКС показывают, что у гадобутрола она примерно в 2 раза ниже по сравнению с другими 0,5-молярными препаратами (табл. 15.15).

Таблица 15.15

Острая внутривенная токсичность макроциклических МРКС

МРКС	LD_{50} (мыши)
Гадотерат	11,4 ммоль/кг массы тела
Гадотеридол	11–14 ммоль/кг массы тела
Гадобутрол	23 ммоль/кг массы тела

Проведение всего спектра доклинических исследований показало отсутствие у Гадовиста эмбритоксичности, тератогенности, генотоксичности, канцерогенности, связывания с белками и ферментами или каких-либо других токсических эффектов.

Для контрастирования ЦНС у взрослых всю дозу Гадовиста 1,0 (0,3 ммоль/кг массы тела) вводят внутривенно в виде болюса. В клинических исследованиях были показаны отличные системная и местная толерантности Гадовиста 1,0 в дозе до 0,5 ммоль/кг массы тела. Важно подчеркнуть особенно хорошую переносимость Гадовиста 1,0 как со стороны нервной системы, так и других органов и тканей. В частности, даже у больных с тяжёлыми заболеваниями почек, находящихся на диализе, введение Гадовиста 1,0 не приводило к подъёму креатинина в крови.

Серьёзных побочных реакций в ходе этого многоцентрового исследования не наблюдалось. За исключением одной аллергической реакции, которая была купирована после применения стероида, все побочные реакции были слабыми или умеренными; наиболее частыми из них (1,4%) были ощущение тепла или чувство боли в месте инъекции. Основные жизненно важные функции после введения Гадовиста 1,0 не претерпевали никаких клинически значимых изменений [10, 40–45]. Значения систолического и диастолического артериального давления и частота пульса значительно не изменялись. Аналогичные данные были получены при более обширном многоциентровом исследовании безопасности применения Гадвоситта 1,0 при проведении МР-ангиографии у 435 пациентов (J. O. Balzer и др., 2003). У данных пациентов определяли биохимические параметры крови и мочи, а также анализировали пока-

затели ЭКГ до и после болюсного введения Гадовиста 1,0 в дозах до 0,3 ммоль/кг массы тела. Лишь у 4,6% больных выявлены слабые, не имеющие клинического значения, побочные эффекты типа изменения вкуса, тошноты и головной боли, зуда, которые могли быть связаны с введением препарата. Важно отметить, что в ходе этого исследования не было выявлено участия гадобутрола в реакциях переноса металлов, о чём свидетельствовала неизменность уровня цинка в крови, и подтверждена отличная почечная толерантность Гадовиста 1,0 (отсутствие изменения уровня креатинина даже у больных с предшествующими заболеваниями почек).

Таким оброазом, благодаря преимуществу, заключающемуся в меньшем объёме вводимой дозы, особенно в случае методов, требующих высоких доз, двукратная концентрация Гадовиста 1,0 открывает новые возможности в МР-диагностике при проведении высокодозных исследований, получении изображения первого пассажа, выявлении мелких повреждений и для визуализации поражений, трудно контрастируемых обычными средствами, т. е. в тех в случаях, когда выявление или исключение дополнительных очагов поражения может повлиять на проводимое лечение или врачебную тактику [24, 25, 31, 33].

Проведённые клинические исследования использования Гадовиста 1,0 для диагностики первичных опухолей и метастазов показали, что увеличение дозы Гадовиста с 0,1 до 0,3 ммоль/кг массы тела статистически достоверно увеличивает выявляемость патологических изменений в головном мозге. Таким образом, Гадовист 1,0, имеющий двукратную концентрацию гадолиния, в тройной дозе делает лучевую диагностику по своей специфичности и чувствительности практически стопроцентной.

15.2.2. Тканеспецифические МРКС. Для получения специфичного контрастного усиления МРТ-изображений гепатобилиарной системы используют два типа МРКС:

1) МРКС, концентрирующиеся в гепатоцитах;

2) МРКС, концентрирующиеся в ретикуло-эндотелиальной системе (РЭС) печени.

Все препараты этого ряда имеют низкую гидрофильность; незначительно связываются белками плазмы крови; имеют дозозависимую фармакокинетику; биотрансформации подвергаются преимущественно не парамагнитные центры, а их носители (после чего парамагнитные агенты либо выводятся почками в неизменённом виде — хелатные комплексы парамагнетиков, либо частично выводятся с желчью, а частично депонируются в организме — железосодержащие частицы); не участвуют в кишечно-печёночной рециркуляции.

Гепатотропные МРКС захватываются печёночными клетками и затем с помощью простой диффузии или транспортных белков экскретируются в кишечник через желчные протоки (что даёт возможность их контрастировать). На МРТ-изображении мы видим здоровую ткань, которая обладает способностью накапливать контраст, в то время как ткань опухоли не обладает свойством тканеспецефичного захвата этих веществ.

Гепатотропные МРКС более безопасны, чем йодированные холецистографические контрастные средства, за счёт того, что:

1) высокая чувствительность МРТ позволяет использовать МРКС в дозах, которые в 10 раз ниже, чем рекомендуемые для рентгеноконтрастных средств;

2) гепатобиллиарные МРКС незначительно взаимодействуют с компонентами плазмы крови (около 10%), что объясняет меньшее различие фармакокинетики этих веществ у отдельных пациентов.

В клинике уже используются некоторые тканеспецифические МРКС — это Примовист (гадоксетовая кислота), Резовист (гадобенат димеглюмина Gd-BOPTA),

Тесласкан (мангафодипир, Мп-DPDP) и др. Следует отметить, что из группы гепатотропных МРКС наиболее перспективным препаратом является Примовист (гадоксетовая кислота, Gd-EOB-ДТПА), который уже разрешён для клинического применения. Он отличается от Магневиста наличием этоксибензиловой боковой цепи, которая определяет высокое сродство вещества к гепатоцитам и позволяет контрастировать печень. За счёт снижения T_1 позволяет не только выявлять опухоли печени, но и определять их природу благодаря возможности исследовать кинетику накопления и выведения контрастного материла в структурах печени.

Мп-DPDP при клинической оценке показал значительное увеличение отношения сигнал/шум на T_1 МРТ-изображениях. Он оказался эффективным при получении T_2-взвешенных МРТ-изображений (последовательность SE) и T_1-взвешенных (последовательность GR) МРТ-изображений цирротических узлов и карциномы печени. Гадобенат димеглюмина Gd-BOPTA представляет собой октадентатный хелат гадолиния, который при внутривенном введении (0,005–0,2 ммоль/кг веса тела) быстро распределяется в организме и элиминируется билиарной и ренальной экскрецией в неизменённом виде. МРКС используется для контрастирования печени при МРТ. Билиарная экскреция препарата идёт, главным образом, через специфическую печёночную транспортную систему, которая сопряжена с транспортной системой бромсульфофталеина/билирубина. Клинические испытания этого МРКС говорят о перспективности его использования для определения аденокарциномы, карциносаркомы, рабдомиосаркомы и гепатомы печени; показана эффективность при экспериментальных моделях патологий печени на животных.

В связи с тем что создание новых типов МРКС, особенно с направленной органотропностью, является актуальной задачей, в своей работе мы провели сравнительное изучение релаксационных характеристик (в различных органах и тканях подопытных животных) и острой токсичности вновь синтезированного комплекса гадолиния с 1,4,7,10-тетрааза-2,6-пиридинофан [12]-1,4,7-триуксусной кислотой (Gd-L) с известным МРСК Магневистом (Gd-ДТПА).

Комплекс Gd-L состава 1 : 1 получен взаимодействием эквимолярных количеств водных растворов хлорида гадолиния и 1,4,7,10-тетрааза-2,6-пиридинофан-1,4,7-триуксусной кислоты при pH 6,0–6,5.

Для изучения влияния внутривенного введения гадолинийсодержащих комплексов на релаксацию протонов внутренних органов использовали белых беспородных крыс массой 150–200 г. Животных забивали декапитацией через 10, 20, 30, 60 мин после инъекции. Брали пробы крови, почек, мозга и определяли время T_1 спин-решёточной релаксации ядер водорода этих тканей. В работе использовали 0,125 М водный раствор Gd-L в дозе 0,1 ммоль/кг, что соответствует дозе Магневиста, используемой в клинике. Для определения острой токсичности использовали стандартный метод оценки LD_{50} при внутривенном введении, 0,5 М водного раствора Gd-L.

Время спин-решёточной релаксации протонов тканей и органов, животных до и после введения гадолинийсодержащих веществ измеряли на протонном магнитно-резонансном релаксометре Красноярск-88 (Россия) с резонансной частотой протонов 22 МГц. Для определения T_1 использовали импульсную последовательность инверсия–восстановление. При получении каждой точки усреднение проводили минимум по 3–5 повторениям с 3–5 накоплениями. Были применены ампулы диаметром 8 мм. Измерения проводили при температуре 34–37 °С.

Для предварительной оценки релаксационной эффективности комплекса Gd-L было проведено определение средней эффективности релаксации $(T_1 \cdot C)^{-1}$ путём измерения T_1 протонов в растворах с различной концентрацией Gd-L. Согласно полученным данным $(T_1 \cdot C)^{-1}$ равна $5{,}0 \pm 1{,}0$, что близко к таковому значению для Магневиста.

Сопоставление данных по острой токсичности Gd-L и Магневиста демонстрирует некоторое преимущество Gd-L: LD_{50} Gd-L составляет 7,5 ммоль/кг и LD_{50} Магневиста — 5,6 ммоль/кг.

При изучении зависимости относительного изменения скорости спин-решёточной релаксации ядер ^1H крови, сердца и мозга животных от времени после введения Gd-L и Магневиста обнаружено, что относительное изменение скорости релаксации в крови в случае комплекса Gd-L приблизительно в 2 раза больше, чем для Магневиста (в интервале времени до 20 мин). Такое же соотношение в пользу Gd-L достигается к 25–30 мин в ткани сердца. Следует подчеркнуть, что наши данные говорят о предпочтительности использования Gd-L во всём исследованном временном диапазоне. Что касается ткани мозга, то комплекс Gd-L в полной мере демонстрирует свою более высокую релаксационную эффективность лишь к 50–60 мин после введения.

Эти данные свидетельствуют о перспективности использования комплекса гадолиния с 1,4,7,10-тетрааза-2,6-пиридинофан-1,4,7-триуксусной кислотой в качестве основы при создании нового парамагнитного контрастного вещества для магнитно-резонансной томографии.

Ряд МРКС специфически накапливается ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС). Накопление этих МРКС базируется на фагоцитозе малых частиц клетками РЭС. Основные усилия в этом направлении сосредоточены на создании МРКС с частичной селективностью по отношению к купферовским клеткам печени и селезёнки, чтобы избежать распределения этих МРКС во внеклеточном пространстве и уменьшить дозу, необходимую для достаточного изменения МРТ-сигналов тканей печени и селезёнки. Нормальные ретикуло-эндотелиальные макрофаги фагоцитируют частицы, а в канцерогенной ткани фагоцитоз отсутствует, тем самым достигается селективное изменение МРТ-сигнала неопластической ткани. На долю лимфатических узлов и костного мозга приходится менее 10% фагоцитирующих клеток, в то время как 80% этих клеток находится в печени и 10% в селезёнке. Эффективный метод получения РЭС-специфичных МРКС связан с инкапсуляцией уже известных МРКС (например, Gd-ДТПА) в липосомы. Размер и толщина стенок липосом влияют на фармакокинетику этих визикул. В экспериментах на животных показано, что значительное контрастирование нормальной паренхимы и зоны повреждения печени достигается при введении липосом, содержащих хелатные комплексы Gd^{3+}. Эти же препараты могут служить маркёрами кровянного пула, поскольку они обладают относительно длинным временем полувыведения из крови.

Другим направлением поиска РЭС-специфичных МРКС является получение микроскопических частиц (диаметром меньше 5–35 нм) супермагнитных веществ, таких как магнетит (Fe_3O_4), маггемит (γ-Fe_2O_3) и феррит (соединение оксидов железа и других металлов), покрытых декстраном или декстрановыми производными. Среди железосодержащих МРКС выделяют: SPIO — суперпамагнитный оксид железа; USPIO — суперпарамагнитный оксид железа в виде микрочастиц и MION — монокристаллический оксид железа.

Препараты SPIO ($Fe_2^{3+}O_3$) имеют кристаллическую структуру и сильно ускоряют протонную релаксацию тканей. Диаметр частиц SPIO меньше размера эритроцита, что позволяет им проникать через капиллярную сеть. Разработанные препараты SPIO имеют необходимые размеры для избирательного поглощения клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). После деградации SPIO в РЭС атомы железа включаются в состав гемоглобина эритроцитов. Количество железа, поступающего в организм в составе SPIO при диагностике, значительно ниже общей величины депо железа.

По мнению большинства исследователей SPIO являются тканеспецифическими МРКС, имея тропность к РЭС и позволяя контрастировать печень, селезёнку

и костный мозг. SPIO улучшают визуализацию диффузных и очаговых поражений селезёнки, а также позволяют дифференцировать лимфатические узлы с метастазами от нормальных. R. Hammersting и др. сообщил о результатах применения SPIO для диагностики очаговых поражений печени у 900 больных. Чувствительность метода МРТ в сочетании со SPIO составила 93,8 %, а специфичность — 91,5 %.

МРТ в сочетании с UPSIO позволяет получить хорошую визуализацию опухолей костного мозга и дифференцировать опухолевые очаги от участков гиперплазий.

В 1996 г. появились сообщения о применении UPSIO для МР-ангиографии у человека. Препарат AMI-277 (синерем) улучшал визуализацию почечной артерии и правой коронарной артерии. W. Mayo-Smith и др. исследовали аорту, нижнюю полую вену и воротную вену у 16 больных до и после применения AMI-277. Все сосуды были визуализированы в течение 45 мин.

С помощью вещества NC100150 (кларискан) можно проводить коронарную МР-ангиографию и получать изображение центральных, сегментарных и субсегментарных артерий. При использовании UPSIO в виде болюса для перфузионных исследований не обнаружено каких-либо побочных реакций.

Микрочастицы суперпарамагнитного оксида железа помогают выявлять ишемические поражения головного мозга на ранних стадиях. SPIO оказался пригодным для идентификации участков ишемии миокарда. Сочетание МРТ с UPSIO позволяет оценивать функцию почек и их гемодинамику.

Для создания органототропных МРКС на основе частиц суперпарамагнитного железа можно использовать их конъюгаты со специфическими антителами. В частности, имеются данные о возможности идентификации инфаркта миокарда с помощью антимиозиновых антител, конъюгированных с монокристаллическим оксидом железа (MION).

В сравнении с другими МРКС острая и хроническая токсичность SPIO у животных выражена в меньшей степени. В дозе, превышающей диагностическую в 100 раз, SPIO не вызывал видимых изменений в органах и тканях у экспериментальных животных.

Препараты SPIO, имеющие сравнительно большие размеры частиц, предназначены для контрастирования желудочно-кишечного тракта. Обычная доза SPIO (900 мл) для контрастирования всего кишечника хорошо переносится.

Ультрамалые частицы железа USPIO можно использовать для целей МР-ангиографии. Так же как и в случае с SPIO, после введения SSPIO или USPIO частицы железа поглощаются клетками РЭС путём фагоцитоза. UPSIO позволяет отличать реактивно увеличенные лимфоузлы от злокачественных опухолей. Имеются сведения о перспективности применения UPSIO для оценки стадии заболевания раком молочной железы.

Согласно A. J. Nicolas и др., частицы суперпарамагнитного оксида железа обеспечивают получение ценной диагностической информации при злокачественных опухолях печени, а также при наличии гемангиом, кист, узловых гиперплазий.

Суперпарамагнитные частицы, в отличие от большинства хелатных комплексов парамагнитных веществ, вводятся в организм в виде суспензии. Эти МРКС фагоцитируются РЭС здоровой ткани, при этом уменьшается время релаксации T_2, что снижает МРТ-сигнал здоровой ткани печени. Опухолевая ткань или повреждённая ткань, как правило, не обладает РЭС-активностью. Даже в мельчайших концентрациях суперпарамагнитные вещества обладают высокой эффективностью, вызывая сильное изменение МРТ-сигнала. В странах Европейского Союза для целей контрастирования ретикуло-эндотелиальной системы применяется препарат Резовист (феруркарботран), представляющий собой стабильный водный раствор покрытых карбоксидекстраном наночастиц суперпарамагнитного оксида железа для внутривенного

введения. В 1 мл его растовора содержится 28 мг железа в форме ферукарботрана. Ферукарботран состоит из покрытых карбоксидекстраном наночастиц суперпарамагнитного оксида железа в соотношении 1,1 : 1 (об.). По размеру покрытые частицы оксида железа сходны с большими белками биологических систем.

Благодаря супермагнитным свойствам оксида железа контрастное средство укорачивает преимущественно время релаксации T_2 и вызывает эффекты микроскопической восприимчивости (возмущение локального магнитного поля). Оба механизма обусловливают выраженное снижение сигнала в ближайшем окружении оксида железа, вызывая изменения на T_2- и T_2^*-взвешенных изображениях. Влияние на T_2^* в особенности выражено после фагоцитирования (фаза аккумуляции) Резовиста клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). Кроме того, высокую способность Резовиста влиять на время релаксации T_1 можно использовать для получения динамического изображения сосудистой фазы и выявления сосудов с помощью последовательностей для магнитно-резонансной ангиографии (МРА).

Физико-химические свойства готового к использованию раствора Резовиста представлены в табл. 15.16.

Таблица 15.16

Физико-химические свойства готового к использованию раствора Резовиста

Осмоляльность, мОсм/кг H_2O, при 37 °C	333
Вязкость, мПа · с, при 37 °C	1,03
Плотность, г/мл, при 37 °C	1,057
pH	5,0–7,0

После однократного внутривенного введения Резовист распределяется в сосудистом пространстве и быстро исчезает (двухфазно) из крови/плазмы вследствие избирательного поглощения ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС), преимущественно печени и селезёнки. Биодеградация ядра ферукарботрана, содержащего оксид железа, происходит в клетках РЭС.

Примерно 20% карбоксидекстрана по своему биораспределению имеет большое сходство с оксидом железа, свидетельствуя тем самым об аккумуляции этой фракции карбоксидекстрана органами РЭС (особенно печенью и селезёнкой) без отсоединения от железного ядра Резовиста.

Окончательная биотрансформация заключается во включении железа ферукарботрана в «обычный пул железа организма». Следовательно, судьба железа Резовиста в конечном итоге идентична той, которая присуща нормальному биологически доступному железу.

В максимальной диагностической дозе (1,4 мл/пациент, эквивалентно 39,2 мг Fe) Резовист повышает общее количество железа в организме очень незначительно ($< 2\%$).

При проведении клинических испытаний (фаза 1) обнаружено, что время полупревращения железа Резовиста в сыворотке в начальную фазу, $t_{1/2,\alpha}$, составляет $0{,}257 \pm 0{,}190$ ч или меньше, а в конечную фазу, $t_{1/2,\beta}$, $4{,}36 \pm 0{,}75$ ч или меньше. Времена полупревращения $t_{1/2,\alpha}$ и $t_{1/2,\beta}$ не зависят в значительной степени от вводимых доз.

В экспериментах на животных (крысы) показано, что основная часть ($> 70\%$) карбоксидекстрана Резовиста быстро выводится почками. При этом карбоксидекстран с оксидом железа постепенно выводится печенью.

Резовист предназначен для магнитно-резонансной визуализации (МРВ) печени. Он улучшает выявление поражений (например, количество, размер, распределение по долям, наглядность) и позволяет получить дополнительную информацию относительно классификации и характеристики очаговых поражений печени, увеличивая достоверность диагноза.

Готовый к использованию раствор следует вводить через прилагаемый фильтр путём болюсной инъекции с последующим введением стерильного физиологического раствора (10–20 мл) для промывки системы внутривенного ведения.

У пациентов с массой тела от 35 до 60 кг доза Резовиста составляет 0,9 мл (эквивалентно 25,2 мг Fe). У пациентов с массой тела 60 кг и более доза Резовиста составляет 1,4 мл (эквивалентно 39,2 мг Fe). Максимальная доза Резовиста 0,08 мл (эквивалентно 2,24 мг Fe)/кг массы тела), испытанная у людей, переносилась хорошо.

Сразу после болюсного введения Резовиста рекомендуется проведение динамической визуализации с помощью T_2^*-взвешенной или T_1-взвешенной последовательностей с градиентным эхом. Визуализацию в фазе накопления можно осуществлять через 10 мин–8 ч после введения с помощью T_2^*- или T_1-взвешенных МР-методик, например обычной методики T_2-спинового эха (СЭ) или быстрого спинового эха/«турбо» спинового эха (БСЭ/ТСЭ).

Диагностическую информацию о внутрипечёночных сосудах можно получать с помощью времяпролётных (ВП) последовательностей для ангиографии в течение 20 мин после введения Резовиста. Диагностическая процедура с применением контрастных средств должна проводиться под руководством предварительно обученного врача, владеющего всем объёмом соответствующих знаний.

Как известно, индукция декстраном анафилактоидных реакций происходит очень редко даже у больных с высокими титрами декстрановых антигенов. Несмотря на то что Резовист содержит низкомолекулярный карбоксидекстран, нельзя исключить возможность возникновения аллергоподобных/анафилактоидных реакций. Лекарственные средства и оборудование (например, интубационная трубка и респиратор кислорода) должны быть готовы к использованию при проведении исследования.

После применения Резовиста наблюдались анафилактоидные реакции/реакции гиперчувствительности. Возможны серьёзные реакции, включая анафилактоидный/аллергический шок. Большинство этих реакций возникает в течение часа после введения Резовиста. Однако могут развиваться также отсроченные кожные реакции (от часов до дней). У пациентов с предрасположенностью к аллергии, включая бронхиальную астму в анамнезе, решение по использованию Резовиста принимают после тщательного взвешивания соотношения риск/польза.

Следует помнить, что у пациентов с патологией, связанной с избытком железа (например, гемосидероз), высокое содержание железа в печени влияет на интенсивность печёночного сигнала. Поэтому ожидаемая польза от введения Резовиста может быть ограничена.

Для исключения паравенозного введения, которое может привести к длительному местному пигментноподобному изменению цвета кожи, необходимо удостовериться в правильном положении инъекционной иглы с помощью предварительного введения стерильного физиологического раствора перед инъекцией Резовиста.

Большинство нежелательных эффектов имеют интенсивность от слабой до средней. В результате проведения клинических исследований на более чем 1000 больных наблюдались следующие нежелательные эффекты, классифицированные как возможные, вероятные, определённые:

— весь организм в целом: боль, астения и боль в спине — менее чем в 1% случаев;

— сердечно-сосудистая система: вазодилатация — менее 2%, боль в груди — менее 1%, гипертония и флебит — менее 0,1%;

— нервная система: парестезия — менее 2%, головная боль — менее 1%, гипестезия, страх, головокружение и судороги — менее 0,1%;

— отдельные ощущения: изменение вкуса менее 1% и паросмия — менее 0,1%;

— дыхательная система: одышка, повышенный кашель и ринит — менее чем 0,1%;

— кожа: зуд и сыпь — менее 1%, экзема и крапивница — менее 1%;

— местное раздражение: реакции в месте введения — менее 1%;

— гиперчувствительность — менее 0,1%.

В связи со снижением активности фактора XI может происходить транзиторное и слабое увеличение частичного тромбопластинового времени без изменения теста по Квику. После введения Резовиста наблюдается дозозависимое увеличение уровня железа и ферритина в плазме с максимумом через 24 ч без изменения общей железосвязывающей способности. Исследование острой токсичности продемонстрировало отсутствие риска острой интоксикации при использовании Резовиста.

Доказана безопасность дозы до 0,08 мл (эквивалентно 2,24 мг Fe)/кг массы тела (она примерно в 4 раза больше диагностической дозы) у здоровых добровольцев.

Таким образом, анализ литературы по железосодержащим МРКС позволяет заключить, что эти препараты можно использовать в качестве органотропных РКС, но насколько они смогут конкурировать с гадолинийсодержащими тканеспецифическими МРКС, покажет время. Можно ожидать расширения показаний для их применения.

15.2.3. Магнитно-резонансные контрастные средства для контрастирования желудочно-кишечного тракта. МРТ не всегда удовлетворительно дифференцирует полостные органы брюшной полости и патологические повреждения кишечника. Для этой цели была разработана специальная формула препарата, содержащая 1 ммоль Gd-ДТПА и 15 г/л маннитола (Магневист энтерал). МРКС вводили орально или ректально. После введения всасывание Gd-ДТПА слизистой оболочкой ЖКТ является несущественным, что позволяет использовать Gd-ДТПА не только при внутривенном введении, но и как растворы для энтерального введения, с целью заполнения кишечника при получении МРТ-изображения ЖКТ. Для контрастирования МРТ-изображения верхнего отдела ЖКТ доза МРКС должна составлять не менее 300 мл, а если необходимо получить полное изображение ЖКТ, то не менее 1000 мл; ректально вводят 20–500 мл препарата. Побочные реакции наблюдали у 11 из 183 пациентов (6%). В 10 случаях отмечали симптомы влияния на ЖКТ — метеоризм и диарею. Эти изменения могут определяться бактериальным разложением маннитола или же введением большого объёма жидкости. Ни один из 11 пациентов не требовал лечения.

В обычной лекарственной форме при введении через ЖКТ Магневист даже на T_2-взвешенных МРТ-изображениях даёт позитивный контрастный эффект, контрастируя нормальную, воспалённую или содержащую опухоль печень на фоне желудка, двенадцатиперстной кишки, петель кишечника. Этот метод используют также для лучшей дифференцировки органов ЖКТ от окружающей опухоли (например, лимфомы). Артефакты изображения и повышенное отношение сигнал/шум, который возрастает из-за перистальтики кишечника, наполненного позитивным МРКС, можно уменьшить с помощью Глюкагона или Бускопана. Магневист при этом даёт лучший контраст между тканью опухоли и кишечником, чем негативные МРКС (частицы оксида железа), сохраняя достаточную контрастность с жировой тканью при использованием T_2-взвешенных последовательностей.

15.2.4. Цифровая субтракционная магнитно-резонансная томография головного мозга с использованием гадолиния: метод снижения дозы котрастного средства. Применяя магнитно-резонансные контрастные средства (МРКС), можно значительно увеличить диагностическую эффективность T_1-взвешенной магнитно-резонансной визуализации головного мозга. Ранее для увеличения контрастности изображения головного мозга стремились повысить дозу МРКС или использовать более высокое напряжение магнитного поля. Однако совершенствование технических устройств, применяемых для магнитно-резонансной визуализации, показало, что такого же результата можно добиться с помощью метода цифровой субтракции [4, 5], который широко применяется в лучевой диагностике.

Группе учёных из Гонконга J. H. M. Chan и др. удалось продемонстрировать возможность использования уменьшенной дозы МРКС для выявления патологических изменений в головном мозге с помощью цифровой субтракционной магнитно-резонансной визуализации. Стандартную (0,1 ммоль/кг), а затем половинную дозу (0,05 ммоль/кг) гадопентетата димеглюмина (Магневиста) внутривенно вводили 52 больным, у которых были выявлены внутричерепные поражения с помощью компьютерной томографии. Выявленные поражения головного мозга (одиночные или множественные), представляли собой первичные опухоли, метастазы, абсцессы или были следствием развития рассеянного склероза. Все опухоли и абсцессы мозга подвергались дополнительно гистологическому исследованию. Величины поражений подразделялись на маленькие (<5 мм), средние (<10 мм) и большие (>10 мм).

После получения МР-томограммы до контрастирования с помощью T_1-взвешенной последовательности спинового эха сразу же начинали сканирование вслед за введением контрастного средства, сводя к минимуму промежуток времени между двумя последовательностями импульсов. Такой метод был выбран вследствие идентичности параметров до и после контрастирования. Для укорочения времени исследования получали изображение только в трансаксиальной плоскости.

Одному и тому же больному полную и половинную дозы контрастного средства вводили в разные дни, так как больные не должны чувствовать дискомфорт, связанный с проведением повторного исследования в один и тот же день. При этом следует отметить, что контрастирующий эффект от введения полной дозы контрастного средства в разные дни был идентичен.

Оказалось, что цифровая субтракция позволяет статистически достоверно увеличить в 2–3 раза контрастность магнитно-резонансного изображения (разницу в величине сигнала между патологическим очагом и окружающей нормальной тканью). При этом визуализация поражений головного мозга при использовании полной дозы Магневиста без цифровой субтракции и после введения его половинной дозы, но с цифровой субтракцией была примерно одинаковой ($p > 0{,}05$).

Эти предварительные результаты свидетельствуют о том, что цифровая субтракция при визуализации головного мозга с помощью T_1-взвешенной последовательности спинового эха позволяет снизить обычную дозу МРКС на 50 %.

15.2.5. Поиск новых магнитно-резонансных контрастных средств

Ангиографические макромолекулярные вещества. Специальные маркёры внутриваскулярного пространства могли бы быть использованы для количественного определения перфузии крови в различных тканях и органах (например, при инфарктах миокарда и т. д.) в течение достаточно длительного времени. Разработка таких МРКС позволила бы сочетать функциональную диагностику, обеспечиваемую методами ядерной медицины, с эффективностью высокого разрешения МРВ. Для того чтобы предотвратить прохождение подобных МРКС через гистогематические

барьеры из нормальных кровяных сосудов и воспрепятствовать их быстрой гломерулярной фильтрации, необходимо иметь молекулы МРКС с массой больше, чем 30 кДа. С целью контрастирования сосудов Gd-ДТПА ковалентно связывают с такими макромолекулярными веществами, как альбумин, декстран, полилизин и другие. МРКС этого типа в экспериментах на животных позволили получить хорошее качество МРТ-изображений артерий и вен диаметром менее 1 мм. Они также могут использоваться для прямой и непрямой МРТ-лимфографии. Было выявлено, что такие комплексы-МРКС могут проходить гематоэнцефалический барьер не только в случае грубых нарушений целостности сосудистого русла, но и при повышенной капиллярной проницаемости (например, при воспалении в активной фазе, при опухолях и при ишемии). Однако при введении таких макромолекулярных МРКС становится актуальной проблема возможной сенсибилизации организма. В работе методом фермент-связанной иммуносорбентой пробы ELISA показано, что при сенсибилизации крыс комплексами Gd-ДТПА-альбумин, Gd-ДТПА-димеглюмин, Gd-ДТПА-декстран и Gd-ДТПА-полилизин начинается выработка антител IgG, специфичных против Gd-ДТПА. Несомненно, требуются дополнительные исследования, чтобы определить потенциал иммунного ответа человека к макромолекулярным МРКС в условиях их клинического использования.

Предлагаемый в качестве маркёра кровеносного русла макромолекулярный МРКС Gd-ДТПА-полилизин со средним молекулярным весом 48700 кДа, оказался в 3 раза более эффективным веществом, увеличивающим скорость релаксации, чем сам хелатный комплекс Gd-ДТПА. LD_{50} этого препарата для мышей составляло 17 ммоль/кг веса, что чуть больше, чем для самого Gd-ДТПА. Элиминация Gd-ДТПА-полилизина из организма крыс осуществлялась главным образом через почки практически без биодеградации. Аналогичное макромолекулярное МРКС несколько меньшего размера (40 кДа) оказалось эффективным при обнаружении дефектов лёгочной перфузии у крыс. Интенсивность МРТ-сигнала перфузируемых лёгких повышалась более чем на 200% и оставалась стабильной в течении 1 ч, тогда как при эмболизации лёгкого — всего на 25%.

Макромолекулярное МРКС позволило с помощью МРТ проводить динамическое наблюдение за локальными изменениями объёма крови в процессе развития инсульта головного мозга. Показано, что при внутривенном введении Gd-ДТПА, связанного с сывороточным альбумином человека, интенсивность сигнала на T_1-взвешенных МРТ-изображениях повышалась в сером веществе коры и белом веществе головного мозга и в области базальных ганглиев, где была увеличена напряжённость CO_2.

При проведении сравнительного анализа возможности использования МРКС малого и большого веса для изучения проницаемости гематоэнцефалического барьера при астроцитарной глиоме выявлена их высокая эффективность при проведении МРТ-диагностики.

Комплекс Gd-ДТПА-декстран с молекулярным весом декстрана 70,8 кДа проявил высокую химическую стабильность и более высокую релаксационную активность *in vitro* (при 100 МГц — в 1,5–2,3 раза выше), чем обычный Gd-ДТПА. В экспериментах было показано пролонгированное (более 1 ч), по сравнению с Gd-ДТПА, усиление почечной коры, мозгового вещества почек и ткани печени, в то время как МРТ-параметры стромальных элементов паренхимы этих органов при этом не изменялись.

Из препаратов, длительно находящихся в кровеносном русле, разработки которых достигли уровня клинических испытаний, следует отметить гадолинийсодержащий полимер (Гадомер-17), ультрамалые частицы оксида железа (SHU 555 C), гадолинийсодержащий хелат с дифенилициклофосфатом, имеющим сродство к сывороточному альбумину (MS-325), и средство, позволяющее выделять участки некроза

тканей, в частности при инфаркте миокарда (Gadophrin-2, содержит два атома гадолиния).

Для избирательной визуализации тех или иных органов необходимы органотропные диагностические средства. Препараты, высокоспецифичные по отношению к интересующей нас ткани-мишени, имеют более низкую дозу введения, необходимую для достижения эффективной концентрации препарата в этой ткани, и меньшую выраженность побочных реакций, так как в этом случае, кроме уменьшения количества вводимого вещества, почти не возникает взаимодействия с другими тканями. Путём специальных модификаций хелатирующих лигандов исследователям удалось создать ряд МРКС, которые могут специфически поглощаться гепатоцитами и клетками ретикуло-эндотелиальной системы.

Опухолеспецефичные вещества. При формировании комплексов МРКС с моноклональными антителами можно получить высокоспецифичные МРКС не только к данному виду нормальных тканей, но и к конкретному типу патологически изменённых тканей [26]. В экспериментах уже получены такие комплексы, например иммуноспецифичные к эмбриональному антигену карциномы прямой кишки. К сожалению, был выявлен и целый ряд препятствий: малое количество доступных связывающих мест на поверхности малигнизированных клеток и сравнительно низкая специфичность полученных антител. Тем самым, более традиционная сцинтиграфия в большей степени адекватна при диагностике, поскольку позволяет использовать концентрации радионуклидов около 10^{-9} М, в то время как для МРКС требуется достижение в тканях концентраций не ниже 10^{-6} М. Биотрансформация комплекса МРКС и антитела в организме происходит, прежде всего, с отщеплением иммуноглобулина и, соответственно, с потерей специфичности. Нормальная печень, очищая кровь от инородных белков, тем самым будет, во-первых, сокращать время жизни комплекса в организме, а во-вторых, осуществлять неспецифическую аккумуляцию комплекса МРКС с антителами в печени, что делает проблематичным МРТ-диагностику при её печёночной локализации.

Металлопорфирины. Показана эффективность металлопорфиринов в качестве опухолеспецифичных МРКС при введении в их структуру парамагнитных агентов. Mn^{3+}-тетрафенилсульфонатпорфирин (MnTTPS) показал высокую МРТ-контрастирующую активность в модельных экспериментах с привитой мышам *nude* подкожно карциномы толстой кишки человека и опухоли молочной железы человека 2Т [79]. Mn^{3+}-уропорфирин-1 (Mn-UROP-1) при исследованиях, проведённых на модели внутричерепной опухоли мозга (на крысах 9L), при внутривенном введении повышал контрастность МРТ-сигнала ткани опухоли уже через 30 мин, которое сохранялось затем в течении 24 ч.

15.2.6. Заключение. В мировой медицине идёт интенсивное исследование МРКС и поиск новых препаратов данного ряда и класса. Анализ литературы показывает, что на сегодняшний день весьма актуальными остаются следующие вопросы:

— создание МРКС, тропных к определённым видам тканей и патологических процессов;

— исследование фармакокинетики и фармакодинамики МРКС в норме и при патологии, позволяющие обоснованно проводить динамические исследования и дающие возможность оценивать не только морфологию, но и функцию исследуемой системы;

— изучение молекулярных механизмов взаимодействия МРКС с биомакромолекулами и другими биообъектами, что позволяет расширять наши представления о природе МРТ-контрастирования в норме и при патологических процессах и открывает новые возможности более точной, в том числе дифференциальной диагностики, исключающей необходимость применять инвазивные методы или биопсию;

— разработка новых методов практического применения МРКС, использующих последние достижения в области совершенствования импульсных последовательностей, технологии компьютерной обработки получаемых данных и технического обеспечения современных магнитно-резонансных томографов.

15.3. Ультразвуковые контрастные средства

Ультразвуковые контрастные средства (УЗКС) предназначены для улучшения идентификации анатомических структур и особенностей кровообращения при сонографических исследованиях. УЗКС улучшают контрастное разрешение между нормальной и поражённой тканью и идентификацию глубокозалегающих сосудов, помогают в обнаружении опухолей или сосудов в них. Кроме того, УЗКС улучшают визуализацию стенозов или аневризм сосудов, увеличивают возможность выявлять зоны инфаркта и ишемии, определять структуру ткани.

Применяемые в медицинской практике УЗКС разделяют на следующие типы:

1) микропузырьки газа на частицах галактозы (Эховист) или на частицах галактозы, стабилизированные пальмитиновой кислотой (Левовист);

2) микропузырьки гидрофобного газа (например, гексафторид серы, Соновью).

На основании способности проходить через лёгочные капилляры можно выделить следующие УЗКС:

1) правожелудочковые УЗКС — вещества, контрастирующие только правые отделы сердца (Эховист);

2) левожелудочковые УЗКС — вещества, контрастирующие правые и левые отделы сердца (Левовист, Соновью).

15.4. Радиофармацевтические средства

Применение радиоактивных препаратов в сочетании со специализированной медицинской радиоизмерительной аппаратурой (сканеры, гамма-камеры, томографы) позволяет не только визуализировать отдельные органы, но и выявлять злокачественные опухоли и некоторые виды патологических очагов на ранних стадиях образования. К радиофармацевтическим средствам (РФС) относятся гиппуран-^{131}I, натрия йодид-^{123}I, бенгальская роза-^{131}I и альбумин-^{131}I, макроагрегаты альбумина-^{131}I, технемаг-^{99m}Tc, ^{18}F-дезокси-D-глюкоза и другие.

В последнее десятилетие на первое место в радионуклидной диагностике выходят препараты с короткоживущими радионуклидами ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{18}F и другие.

Препарат Технемаг (^{99m}Tc) применяют для проведения реноrрафии, динамической сцинтиграфии и радионуклидной ангиографии почек у пациентов с различной патологией мочевыделительной системы с целью оценки суммарной и раздельной выделительной функции почек и верхних мочевых путей, исследования их анатомических и топографических особенностей.

Препарат ^{18}F-дезокси-D-глюкоза предназначен для диагностики опухолей и метастазов в лёгких, голове шее, толстом кишечнике, а также лимфом и меланом при проведении позитронной эмиссионной томографии.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 15

1. *Елизарова С.В., Повереннова И.Е., Луценко С.К.* Применение 1,0 М контрастного средства (Гадовист 1,0) в обследовании больных с рассеянным склерозом на магнитно-резонансном томографе Signa 0,5 Тл // Мед. визуал. 2006. № 1. С. 140–144.
2. *Корниенко В.Н., Пронин И.Н., Арутюнов Н.В. и др.* МР-ангиография с применением нового одномолярного контрастного препарата Гадовист 1,0 в нейрохирургической клинике // Мед. визуал. 2004. № 1. С. 16–25.
3. *Панов В.О., Шимановский Н.Л., Степанянц А.У., Сергеев П.В.* Критерий оценки взаимодействия лигандов с макромолекулами по данным ЯМР спектроскопии высокого разрешения // Биофизика. 1988. Т. 33, № 5. С. 776–780.
4. *Сергеев П.В., Свиридов Н.К., Шимановский Н.Л.* Контрастные средства. — М.: Медицина, 1993. — 256 с.
5. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Панов В.О.* Магнито-резонансные контрастные средства // Хим.-фарм. журн. 1989. № 5. С. 540–549.
6. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Ахадов Т.А., Белов С.А., Панов В.О. и др.* Магнитно-резонансные контрастные средства // Химико-фармацевтический журнал. 1993. № 1. С. 30–33.
7. *Тютин Л.А., Панфиленко А.Ф., Арзуманова Н.В.* Магнитная резонансная томография с использованием контрастного препарата Магневист // Вестн. рентген. и радиол. 1996. № 2. С. 6–12.
8. *Тютин Л.А., Шимановский Н.Л., Трофимова Т.Н.* 15 лет клинического применения «Магневиста» — первого магнитно-резонансного контрастного средства // Мед. визуал. 2004. № 3. С. 125–134.
9. *Яковлева Е.К., Тютин Л.А., Шелкопляс Э.Н.* Роль магнитно-резонансной ангиографии с использованием «Магневиста» в диагностике заболеваний аорты // Мед. визуал. 1999. № 2. С. 23–27.
10. *Balzer J.O., Loewe C., Davis K. et al.* Safety of contrast-enhanced MR-angiography employing gadobutrol 1.0 M as contrast material: experience in 436 patients // Eur Radiol. 2003. V. 13, № 9. P. 2067–2074.
11. *Benner T., Reimer P., Erb G. et al.* Cerebral MR perfusion imaging: first clinical application of a 1 molar gadolinium chelate (Gadovist 1.0) in a double-blinded randomized dose finding study // J. Magn. Reson. Imaging. 2000. V. 12. P. 371–380.
12. *Carroll T.J., Korosec F.R., Swan J.S. et al.* The effect of injection rate on time-resolved contrast-enhanced peripheral MRA // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 14. P. 401–410.
13. *Davis K., Douek P., Ebner F. et al.* Gadobutrol-enhanced moving-table magnetic resonance angiography in patients with peripheral vascular disease: a prospective, multi-centre blinded comparison with digital subtraction angiography // Eur. Radiol. 2003. V. 13. P. 2103–2114.
14. *Haage P., Adam G., Karaagac S. et al.* Mechanical delivery of aerosolized gadolinium-DTPA for pulmonary ventilation assessment in MR imaging // Invest. Radiol 2001. V. 36. P. 240–243.
15. *Eiberg J.P., Lundorf E., Thomsen C., Schroeder T.V.* Peripheral vascular surgery and magnetic resonance arteriography: a review // Eur. J. Vasc. Endovsc. Surg. 2001. V. 22. P. 396–402.
16. *Felix R., Heshiski A., Hricak H.* Magnevist. 4th ed. — Berlin: Blackwell Science, 2001. — 242 p.
17. Gadovist 1.0. 1st ed. — Schering AG., 2000. P. 30.

18. *Goyen M., Lauenstein T.C., Herborn C.U. et al.* 0.5 M Gd chelate (Magnevist) versus 1.0 M Gd chelate (Gadovist): dose-independent effect on image quality of pelvic three-dimensional MR-angiography // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 14. P. 602–607.
19. *Goyen M., Ruehm S.G., Barkhausen J. et al.* Improved multi-station peripheral MR angiography with a dedicated vascular coil // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 13. P. 475–480.
20. *Goyen M., Lauenstein T.C., Herborn C.U. et al.* 0.5 M Gd chelate (Magnevist): dose-independent effect on image quality of pelvis three-dimensional MR angiography // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 14. P. 602–607.
21. *Goyen M., Herborn C.U., Vogt F.M. et al.* Using 1 M Gd-chelate (gadobutrol) for total-body three-dimensional MR angiography: Preliminary experience // J. Magn. Reson. Imaging. 2003. V. 17, № 5. P. 565–571.
22. *Hentsch A., Aschauer M.A., Balzer J.O. et al.* Gadobutrol-enhanced moving-table magnetic resonance angiography in patients with peripheral vascular disease: A prospective, multi-centre blinded comparison with digital subtraction angiography // Eur. Radiol. 2003. V. 13, № 9. P. 2103–2114.
23. *Herborn C.U., Lauenstein T.C., Ruehm S.G. et al.* Intraindividual comparison pf gadopentetate dimeglumine, gadobenate dimeglumine, and gadobutrol for pelvic 3D magnetic resonance angiography // Investigative Radiology. 2003. V. 38, № 1. P. 27–33.
24. *Ho V.B., Hood M.N., Hess S.L., Choyke P.L.* Preferential arterial imaging using gated thick-slice gadolinium-enhanced phase-contrast acquisition in peripheral MRA // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 13. P. 714–721.
25. *Kalinowski M., Kress O., Wels T. et al.* 1-molar gadobutrol as a contrast agent for computed tomography: Results from a comparative porcine study // Invest. Radiol. 2003. V. 38, № 4. P. 193–199.
26. *Konda S.D., Aref M., Brechbiel M. et al.* Development of a tumor-targeting MR contrast agent using the high-affinity folate receptor: Work in progress // Invest. Radiol. 2000. V. 35. P. 50–57.
27. *Krause W., Schumann-Gampieri G.* Pharmacokinetics of Contrast Media // In: Contrast Media in Practice, Questions and Answers / Ed. P. Dawson, W. Claub. — Berlin–Heidelberg–N.Y.: Springer-Verlag, 1993. P. 26–34.
28. *Laurent S., Elst L.V., Copoix F. et al.* Stability of MRI paramagnetic contrast media: A proton relaxometric protocol for transmetallation assessment // Invest. Radiol. 2001. V. 36. P. 115–122.
29. *Lee J.J., Chang Y., Tirman P.J. et al.* Optimizing of gadolinium-enhanced MR angiography by manipulation of acquisition and scan delay times // Eur. Radiol. 2001. V. 11. P. 754–766.
30. *Le Duc A.-M., Charvet R., Farion J.-F., Le Bas F.* Esteve In Vivo Measurement of Gadolinium Concentration in a Rat Glioma Model by Monochromatic Quantitative Computed Tomography Comparison Between Gadopentetate Dimeglumine and Gadobutrol // Invest. Radiol. 2004. V. 39. P. 385–393.
31. *Leiner T., Ho K.Y., Nelemans P.J., de Haan M.W., van Engelshoven J.M.* Three-dimensional contrast-enhanced moving-bed infusion-tracking (MoBI-track) peripheral MR angiography with flexible choice of imaging parameters for each field of view // J. Magn. Reson. Imaging. 2000. V. 11. P. 368–377.
32. *Nelemans P.J., Leiner T., de Vet H.C.W., van Engelshoven J.M.A.* Peripheral arterial disease: meta-analysis of the diagnostic performance of MR angiography // Radiology. 2000. V. 217. P. 105–114.
33. *Priebe M., Mohr A., Brossmann J. et al.* Gadobutrol: an alternative contrast agent for digital subtraction dacryocystography // Eur. Radiol. 2002. V. 12. P. 2083–2086.
34. *Rofsky N.M., Adelman M.A.* MR angiography in the evaluation of atherosclerotic peripheral vascular disease // Radiology. 2000. V. 214. P. 325–338.
35. *Ruehm S.G., Hany T.F., Pfammater T. et al.* Pelvic and lower extremity arterial imaging: diagnostic performance of three-dimensional contrast-enhanced MR angiography // Am. J. Roentgenol. 2000. V. 174. P. 1127–1135.

36. *Ruehm S.G., Nanz D., Baumann A. et al.* 3D contrast-enhanced MR angiography of the run-off vessels: value of image subtraction // J. Magn. Reson. Imaging. 2001. V. 13. P. 402–411.
37. *Schaefer F.K. W., Schaefer P.J., Jahnke T. et al.* First clinical results in a study of contrast enhanced magnetic resonance angiography with the 1.0 molar gadobutrol in peripheral arterial occlusive disease — Comparison to intraarterial DSA // RoeFo — Fortschritte auf dem Gebiet der Roentgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren. 2003. V. 175, № 4. P. 556–564.
38. *Schaefer F.K., Schaefer P.J., Jahnke T. et al.* First clinical results in a study of contrast enhanced magnetic resonance angiography with the 1.0 molar gadobutrol in peripheral arterial occlusive disease — Comparison to intraarterial DSA // RoeFo — Fortschritte auf dem Gebiete der Roentgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren. 2003. V. 175, № 4. P. 556–564.
39. *Szabo B.K., Aspelin P., Wiberg M.K. et al.* Invasive breast cancer: correlation of dynamic MR features with prognostic factors // Eur. Radiol. 2003. V. 13. P. 3425–2435.
40. *Tombach B., Heindel W.* Value of 1.0 M gadolinium chelates: review of preclinical and clinical data on gadobutrol // Eur. Radiol. 2002. V. 12. P. 1550–1556.
41. *Tombach B., Bremer C., Reimer P. et al.* Pharmacokinetics of 1 M gadobutrol in patients with chronic renal failure // Invest. Radiol. 2000. V. 35. P. 35–40.
42. *Tombach B., Bremer C., Reimer P. et al.* Renal tolerance of a neutral gadolinium chelate (gadobutrol) in patients with chronic renal failure: results of a randomized study // Radiology. 2001. V. 218. P. 651–657.
43. *Tombach B., Bremer C., Reimer P. et al.* Using a highly concentrated Gadobutrol as an MR contrast agent in patients also requiring hemodialysis: safety and dialysability // AJR Am. J. Roentgenol. 2002. V. 178. P. 105–109.
44. *Tombach B., Bremer C., Reimer P. et al.* Renal tolerance of a neutral Gadolinium chelate (gadobutrol) in patients with chronic renal failure: results of a randomized study // Radiology. 2001. V. 218. P. 651–657.
45. *Tombach B., Benner T., Reimer P. et al.* Do highly concentrated gadolinium chelates improve MR brain perfusion imaging? Intraindividually controlled randomized crossover concentration comparison study of 0.5 versus 1.0 mol / l gadobutrol // Radiology. 2003. V. 226, № 3. P. 880–888.
46. *Wang Y., Winchester P.A., Khilnani N.M. et al.* Contrast-enhanced peripheral MR angiography from abdominal aorta to the pedal arteries. Combined dynamic two-dimensional and bolus-chase three-dimensional acquisition // Invest. Radiol. 2001. V. 36. P. 170–177.
47. *Weigel S., Tombach B., Maintz D. et al.* Thoracic aortic stent graft: Comparison of contrast-enhanced MR angiography and CT angiography in the follow-up: Initial results // Eur. Radiol. 2003. V. 13, № 7. P. 1628–1634.
48. *Weiger M., Pruessmann K.P., Kassner A. et al.* Contrast-enhanced 3D MRA using SENSE // J. Magn. Reson. Imaging. 2000. V. 12. P. 671–677.

Глава 16

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ РАДИОАКТИВНЫХ И ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

В последние годы развитие новых компьютерных и биохимических визуализирующих технологий позволило приблизиться к созданию новых методов диагностики на клеточном и даже молекулярном уровне, которые помогут выяснить природу патологического процесса на самой ранней стадии заболевания, ещё не проявившегося морфологически. Первичная цель молекулярной визуализации состоит в получении информации о ключевых молекулярных механизмах, определяющих функционирование живых систем в норме и при патологии. К молекулярной визуализации в широком понимании относят технологии отображения молекул и/или оценки их функционального состояния (магнитно-резонансная визуализация, позитронно-эмиссионная томография, оптическое отображение, авторадиография, др.) или комбинированные системы, совмещающие разнообразные физические принципы визуализации молекулярных/макромолекулярных мишеней (генов, рецепторов, ферментов, и т. п.) и количественные измерения характеристик визуализируемых объектов. Для анализа изображений изучаемых объектов, получаемых с помощью новых методов молекулярной диагностики, используют системы искусственного интеллекта, системы моделирования заболеваний *in vitro* и *in vivo*.

Молекулярная визуализация (МВ или молекулярный имэджинг) — это метод визуализации отдельных макромолекул организма или диагностики клеточного метаболизма *in vivo*, специфических свойств клетки с возможностью полуколичественной и визуальной оценки. Метод основан на использовании меченных таргетных молекул, за которыми можно следить с помощью позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) или флуоресцирующих веществ.

К таким методам следует в первую очередь отнести способы молекулярной визуализации биомаркёров патологического процесса с помощью принципиально новых радиофармацевтических, магнитно-резонансных и флуоресцирующих низкомолекулярных соединений. Среди этих методов особый интерес представляет флуоресцентная визуализация, так как для её выполнения достаточно использовать очень низкие (микромолярные) концентрации флуоресцирующих веществ и безопасное (иногда даже полезное) лазерное излучение. Однако быстрее можно ожидать внедрение в клинику радиофармацевтических веществ для молекулярной визуализации.

Для точной анатомической локализации участка, где накапливается радиоактивная метка, совмещают ПЭТ с компьютерной томографией ПЭТ/КТ. В сравнении с обычными, рутинными методами появляется возможность оценивать так называемые «предсостояния», а не конечный результат патологического процесса. Главным элементом такого исследования является получение и применение специальных инертных контрастных веществ (как правило, макромолекул), которые не нарушают метаболизма клетки и не приводят к каким-нибудь биологическим изменениям. Например, для диагностики опухоли применяются макромолекулы, которые специфично встраиваются в рецепторные белки на поверхности опухолевой клетки. При помощи гибридомных технологий можно разработать такие макромолекулы с небольшой массой и инертными свойствами. Важным критерием является выбор метки, которую

«несут» контрастные вещества, как правило радионуклиды или флуоресистентные красители. Для достижения максимальной видимой концентрации вещества в клетке-цели нужно применять наименьшее количество препарата, чтобы никак не нарушать ход биопроцессов. Пико-наномолярные концентрации радиофармпрепарата являются на сегодня самыми чувствительными для внутриклеточной диагностики.

В качестве примера можно привести сцинтиграфическую визуализацию рецепторов соматостатина. Нейроэндокринные опухоли, имеющие соответствующие подтипы рецепторов соматостатина (например, гастриномы), характеризуются очень интенсивным накоплением ^{111}In-октреотида, так что с его помощью удаётся наблюдать даже очень небольшие карциномы, часто не поддающиеся обнаружению другими интроскопическими методами. Этот метод применяется также перед началом лечения аналогами соматостатина для обнаружения соответствующих рецепторов *in vivo*.

Другим примером молекулярной визуализации, уже внедрённым в клинику, может быть определение степени обмена глюкозы в тканях с помощью ПЭТ. В настоящее время ПЭТ-установки уже работают в России в нескольких крупных медицинских центрах, также проектируются новые ПЭТ-центры. Повышенный расход глюкозы и повышенная экспрессия переносчиков и транспортных каналов глюкозы (ГЛУТ) во многих злокачественных опухолях обусловливают усиленное поглощение ими меченного изотопом ^{18}F — аналога глюкозы фтордезоксиглюкозы (^{18}F-ФДГ). Измерение накопления ФДГ при исследовании жизнеспособного миокарда характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью, так как ишемизированный миокард в состоянии гибернации отличается особенно высоким поглощением этого радиофармацевтического препарата. Вследствие этого ПЭТ особенно часто используют при обследовании больных из группы риска перед оперативным лечением, чтобы определить, какого эффекта можно ожидать после реваскуляризации.

ПЭТ используется в качестве весьма чувствительного метода не только для определения биологического значения неясных морфологических изменений, но и для предоперационного стадирования, при диагностике рецидивов и контроле лечения большого спектра онкологических заболеваний. Часто только с помощью ПЭТ удаётся обнаружить неизвестную первичную опухоль. Особенно активное накопление фтордезоксиглюкозы наблюдается в случае злокачественных опухолей с высокой тенденцией к пролиферации. Это относится, например, к злокачественным меланомам, опухолям головы и шеи, большинству лимфом, колоректальным ракам и т. д. Большое преимущество ПЭТ состоит в том, что с помощью этого метода можно за один сеанс исследовать всё тело и таким образом обнаружить не только первичную опухоль, но и региональные или удалённые метастазы.

Оптимальным решением в онкологической диагностике является возможность одновременного получения функциональной и морфологической картины. Именно поэтому в последнее время широко использовалось и развивалось картирование (наложение) соответствующих комплементарных срезов КТ и ПЭТ для более подробной оценки. Такие сканеры обладают сложным набором электротехнических и вычислительных приспособлений для проведения сверхбыстрой съёмки, одновременно (в процессе одного сеанса) совмещая рентгеновскую компьютерную томографию и регистрацию сигналов-совпадений γ-квантов в ПЭТ. Эти аппараты имеют также компьютерные программы ориентировки, позволяя одновременно совмещать на экране данные рентгеновской съёмки и ПЭТ-изображения.

Совершенствование технических характеристик детекторов, применяемых в ПЭТ, существенно сократило время исследования тела и улучшило пространственное разрешение. Это открыло горизонт широкого применения короткоживущих радиофармпрепаратов, например ^{11}C-холина, в диагностике рака предстательной железы. Синтез целого ряда молекулярных зондов (лиганды рецепторов, маркёры метаболиз-

ма и т. д.), меченных позитронактивными радионуклидами, сделал в последнее время возможным визуализировать основные молекулярные процессы неопластических клеток, такие как уровень пролиферации, ангиогенез, степень оксигенации, метаболизм аминокислот, апоптоз, связывание антител и рецепторный статус, активность мембранных каналов. Возможность оценивать, например, уровень оксигенации опухоли, является уникальной, так как проведение такого туморобиологического стадирования позволяет выбрать единственно правильное лечение.

В области неврологии ядерная медицина в лице ПЭТ является важным инструментом для определения функциональной активности головного мозга, так как центральная нервная система при нормальных условиях использует в качестве субстрата почти исключительно глюкозу. Таким образом удаётся обнаружить функциональные расстройства даже в отсутствии видимых морфологических изменений. Это особенно важно в случае деменций и экстрапирамидальных нарушений. Учитывая, что использование ПЭТ в клинической практике требует значительных логистических и финансовых затрат, таких как наличие циклотрона для получения позитронактивных радионуклидов, радиохимическая лаборатория и т. д., этот вопрос неоднократно обсуждался специалистами на многочисленных конференциях и во многих публикациях.

Анализ возможностей ядерной медицины в клинической практике позволяет с уверенностью констатировать её интеграцию в лечебный и диагностический процесс. Помимо многочисленных экспериментальных направлений, радионуклидная диагностика позволяет уже сегодня оценивать на молекулярном уровне метаболизм, пролиферацию онкологических клеток, интегрировать и совмещать функциональные данные с морфологическими особенностями. Благодаря комбинации этих данных, а также тесному сотрудничеству врачей-специалистов по ядерной медицине и рентгенологии успешно проведены первые сложные бимодальные ПЭТ/КТ-исследования.

Данный метод диагностики приведёт к значительному выигрышу в отношении как чувствительности, так и специфичности, поскольку сочетание данных ПЭТ и КТ позволяет, с одной стороны, анатомически идентифицировать участки с патологическим поглощением метки, а с другой, — метаболически классифицировать сомнительные образования, полученные в результате КТ-исследования. Включение ПЭТ/КТ-исследований, обеспечивающих получение точно локализованных метаболических параметров, в планирование лучевой терапии, однозначно позволит улучшить её эффективность и снизить лучевую нагрузку на здоровую ткань. Кроме того, комбинация ПЭТ/КТ открывает новые возможности в области прицельной биопсии. Ориентируясь во всём наборе методов ядерной медицины, лечащий врач может рекомендовать не только многомодальную диагностику и оптимальную терапию, но оценивать её эффективность, а также оптимизировать диспансерное наблюдение за своими пациентами. Будущее в клинической практике — междисциплинарное ведение больного или так называемая «интегративная медицина». Важным звеном такого процесса станет, без сомнения, лучевая диагностика и терапия с применением радионуклидных препаратов.

Кроме радиоизотопных меток, для молекулярной визуализации можно использовать методы флуоресценции и магнитного резонанса.

Американская компания VisEn разработала систему молекулярной визуализации химической активности глубоких тканей организма. Флуоресцентные метки позволяют не только визуализировать в живом организме органы, новообразования или места скопления определённых белков, но и оценивать активность протекающих в них биохимических процессов.

Современные методы визуализации, такие как магнитно-резонансная томография, позволяют получить только размер и форму органа или опухоли. Учёные надеются,

что предлагаемая компанией VisEn система молекулярной визуализации, предоставляющая информацию об активности тканей, повысит эффективность ранней диагностики заболеваний, мониторинга эффектов лечения и контроля результатов хирургического вмешательства. Молекулярная визуализация осуществляется за счёт крупных флуоресцирующих молекулярных зондов, взаимодействующих с белками, специфическими для конкретной структуры — раковой опухоли, холестериновых бляшек и т. д., что позволяет исследователям выявлять их локализацию и концентрацию. Некоторые зонды постоянно испускают свечение, другие, обеспечивающие получение более чётких изображений, начинают флуоресцировать только в комплексе с белками-мишенями. Один из предлагаемых разработчиками зондов выявляет фермент, с помощью которого опухоли «расплавляют» окружающие ткани, что необходимо для их роста и размножения. Разработана также метка, идентифицирующая белок, вовлечённый в процессы изменения костей при раке и артрите. Каждая метка испускает свет определённой длины волны, что позволяет одновременно выявлять несколько патологических механизмов.

В фармакологии молекулярная визуализация обеспечивает возможность наблюдения за процессом в живом организме и позволяет устанавливать, действительно ли препарат влияет на механизмы развития заболевания либо только устраняет его симптомы.

Испускаемый зондами свет ближней инфракрасной части спектра регистрируют камерой одновременно под несколькими углами. Полученные снимки с помощью компьютера реконструируют в трёхмерное изображение, которое проецируют на голографическое изображение животного.

По глубине проникновения в организм разработанную компанией VisEn методику можно сравнивать с позитронно-эмиссионной томографией, недостатками которой являются необходимость использования радиоактивных меток и ускорителя заряженных частиц, а главное — невозможность определения уровня активности белков.

Компания VisEn подала заявку в Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на официальное одобрение метода для выявления в организме человека злокачественных опухолей и атеросклеротических бляшек. Одной из проблем является то, что флуоресценция, проходящая через организм мыши, абсорбируется организмом человека. Для решения этого вопроса компания планирует разработать эндоскопы и катетеры для введения регистрирующих камер внутрь организма.

16.1. Молекулярная визуализация с помощью флуоресценции

При оптической визуализации используется электромагнитное излучение (в том числе и лазерное излучение) для прижизненного зондирования тканей пациента с целью получения по отражённому, рассеянному или возбуждённому (флуоресценция) свету диагностической информации о биохимическом составе и анатомическом (морфологическом) строении обследуемого участка мягких тканей тела пациента [1]. Для оптической визуализации биоткани целесообразно использовать излучение с длиной волны, наименее ослабляющейся в ней. Таковым является излучение ближнего инфракрасного (ИК) диапазона (0,8–2,5 мкм), которое может проникать на несколько сантиметров в глубь биоткани, что связано с отсутствием в ней сильных собственных хромофоров, поглощающих свет в этом диапазоне длин волн [2].

В основе применения оптических методов диагностики лежит тот факт, что все основные биохимические и клеточные компоненты тканей обладают характерными «индивидуальными» спектрами поглощения, отражения, рассеяния и флуоресценции. Эти спектры различны для разных мягких тканей и областей уплотнений

в них, для окисленного и восстановленного состояния молекул в клетках ткани. Общее же процентное соотношение разных биохимических и анатомо-морфологических компонентов в тканях различно для состояний нормы и заболевания органов и систем организма. Следовательно, общее функциональное и патофизиологическое состояние тканей отражается на их общих оптических свойствах, которые могут быть зарегистрированы методами лазерного спектрального анализа рассеяния света, спектроскопии отражённого света и флуоресценции и т. п. Современное развитие оптики, электроники и компьютерной техники позволяет проводить такую диагностику *in vivo*, *in situ* и в реальном масштабе времени.

Оптическая (лазерная) визуализация открывает новые уникальные возможности непосредственно в кабинете врача наблюдать прижизненную динамику тех или иных объективных биохимических показателей пациента и корректировать по ним ход курса лечения. Для пациента же, при условии разработки портативных карманных приборов — флуоресцентных томографов, появится возможность проводить ежедневный мониторинг своего состояния здоровья в домашних условиях и на работе [1].

Лазерная флуоресцентная визуализация базируется на анализе характеристик флуоресценции в биотканях эндогенных или экзогенных флуоресцирующих соединений при их освещении низкоинтенсивным лазерным излучением определённых длин волн [3].

Можно выделить два направления развития методов флуоресцентной диагностики. Первое связано с контрастированием тканей экзогенными флуоресцирующими веществами с целью последующего выявления по интенсивности сигнала изображения патологических изменений. А второе связано с созданием более чувствительной аппаратуры, реагирующей на эндогенную (природную) флуоресценцию клеток ткани для осуществления исследования накоплений в тканях природных флуорохромов — флавиновых ферментов, порфиринов — и их функциональной активности. По обоим направлениям разработаны устройства, которые уже разрешены для клинического применения или проходят последние этапы клинических испытаний. Правда, основные области заявленных применений этих систем флуоресцентной диагностики больше относятся к первому направлению. Второе направление в силу ряда нерешённых вопросов научно-технического характера пока ещё остаётся больше на этапах разработки (в частности, в связи с низким содержанием эндогенных порфиринов в тканях для определения их реальной концентрации необходимы высокочувствительные анализаторы) [1].

Флуоресцентные методы позволяют работать с нативными объектами, поскольку при низких интенсивностях свет, возбуждающий флуоресценцию, мало меняет физиологическое состояние тканей, обладают относительно высокой чувствительностью и обеспечивают регистрацию динамики процессов.

Технологии флуоресцентной визуализации можно разделить на интервенционные, т. е. с использованием катетеризации для введения воспринимающих устройств, лазерную флуоресцентную спектроскопию и методы флуоресцентной томографии. В данном обзоре обсуждаются работы, в которых применялись лазерная флуоресцентная спектроскопия, флуоресцентная томография, а также флуоресцентный микроскоп.

На рис. 16.1 схематически изображена система флуоресцентной визуализации распределения контрастного вещества в организме лабораторного животного (FRI — fluorescence reflectance imaging). Эта простая «фотографическая система» состоит из источника лазерного излучения и приёмника флуоресцентного сигнала, которые вместе с объектом исследования помещаются в светонепроницаемую камеру [4].

Для оптической визуализации глубоко лежащих структур необходимо сочетание томографического подхода и компьютерной обработки интенсивности флуоресценции

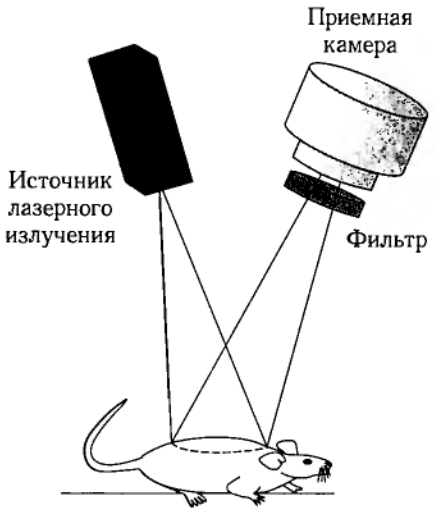


Рис. 16.1. Схема установки флуоресцентной визуализации (V. Ntziachristos, C. Bremer, R. Weissleder, 2003)

разных участков тканей, при котором снимки получаются в виде послойных срезов, что позволяет без труда увидеть и проанализировать патологию. Данная технология, разработанная в течение прошлого десятилетия, названа диффузной оптической томографией (DOT — diffuse optical tomography). Технология молекулярного исследования тканей посредством флуоресценции называется флуоресцентно-опосредованной молекулярной томографией (FMT — fluorescence-mediated molecular tomography) [4].

В экспериментах на животных достаточно простые методы оказались эффективными, позволив наблюдать прижизненную динамику тех или иных объективных биохимических показателей. Однако получены также и первые обнадёживающие результаты у людей. Примером может служить метод оптической (лазерной) маммографии, основанный на использовании электромагнитного излучения с длиной волны, близкой к инфракрасной области спектра, который возбуждает флуоресценцию предварительно введённого в организм специального флуоресцирующего красителя (флуоресцентного контрастного средства SF64), разработанного учёными компании Scherin AG совместно с компанией Fuji Photo Film Co. Преимущество этого метода заключается в высокой специфичности выявления злокачественных новообразований и отсутствии ионизирующей радиации.

Используемое при проведении лазерной компьютерной томографии молочной железы (CTLM) инновационное контрастное средство SF64 даёт специфичный флуоресцентный сигнал, который сможет облегчить диагностику рака молочной железы у женщин с высокой плотностью тканей молочной железы или в тех случаях, когда данные рентгенологической маммографии неоднозначны. Первые исследования, проведённые в центре молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка госпиталя Шаритэ и клинике им. Роберта Рёссле «Гелиос» (все находятся в Берлине), с применением данного инновационного флуоресцирующего контрастного вещества SF64 у женщин с подозрением на рак молочной железы, показали его хорошую переносимость и безопасность. У всех обследованных пациенток границы опухоли были хорошо различимы. Наряду с прочими преимуществами данный инновационный метод предлагает экономически выгодную (низкозатратную) форму постановки диагноза без воздействия ионизирующего излучения, а также во многих случаях

позволяет избежать такой неприятной процедуры, как биопсия. Клинические испытания показали хорошую переносимость и безопасность одной дозы препарата SF64. В последующем клинические испытания будут проводиться с введением различных доз препарата. Данный инновационный метод может способствовать сокращению количества биопсий молочной железы, которые часто выявляют только возрастные тканевые изменения и не позволяют диагностировать рак молочной железы. Кроме того, данный метод может стать полезным для женщин с повышенным генетическим риском рака молочной железы. Эта категория женщин находится в группе риска возникновения онкологических заболеваний молочной железы в раннем возрасте.

Перспективность лазерных флуоресцентных методов визуализации объясняется практичностью, простотой в исполнении и меньшей стоимостью по сравнению с магнитно-резонансной томографией (МРТ) и позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). При использовании флуоресцирующих веществ можно визуализировать фермент, функционирующий в очаге поражения, или специфические молекулы на поверхности клеток или субклеточных структур; в первом случае будет использоваться субстрат, во втором — лиганд рецепторов или конъюгированное с флуорохромом антитело, специфичные для выявляемых молекул.

Основной областью применения методов лазерной флуоресцентной диагностики считается онкология, однако вследствие того, что многие гнойные, раневые, ожоговые и другие деструктивно-воспалительные процессы в тканях также сопровождаются изменением флуоресцентной активности клеток тканей, область применения этих методов в медицине может быть существенно шире [1]. Флуоресцентная визуализация клеточных органелл, ферментов и их активности может дать возможность кардиологам следить за развитием атеросклеротического процесса и дестабилизации покрышки атеросклеротической бляшки (что является крайне важным диагностическим показателем, поскольку последующий разрыв атеросклеротической бляшки с образованием тромба — наиболее распространённая причина развития острых нарушений коронарного кровообращения: нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда, внезапной смерти); онкологам — изучать механизмы развития опухолей и метастазов. Развитие методов флуоресцентной визуализации направлено на создание возможности применения их *in vivo*, наиболее перспективные из этих методов — визуализация протеаз как маркёров атеросклеротических, тромботических и онкологических процессов и визуализация клеточных органелл, в частности лизосом, как ключа к разгадке механизмов различных патологических состояний.

16.2. Визуализация протеаз

Протеазы — спутники воспалительных и онкологических процессов, что делает возможным их использование для диагностики различных заболеваний. Для визуализации активности протеаз недавно были разработаны активируемые зонды (рис. 16.2). Их молекулы состоят из трёх частей: 1) флуорохрома, излучающего сигнал только в свободном состоянии (т. е. только после расщепления протеазаспецифического субстрата ферментом), 2) протеазаспецифического субстрата, 3) носителя — polyLys-MPEG (polyLys — полилизин, MPEG — метоксиполиэтиленгликоль). В результате взаимодействия с ферментом пептидный субстрат расщепляется протеазой, что приводит к высвобождению флуорохрома и увеличению сигнала *in vivo* приблизительно на два порядка. Подобные зонды были разработаны для молекулярной визуализации множества ферментов, включая катепсин S, катепсин B, катепсин D, матричные металлопротеиназы, тромбин, вирусные протеазы [5, 6, 7, 8, 9]. Получаемый флуоресцентный сигнал регистрировали *in vivo* с помощью FRI и FMT.

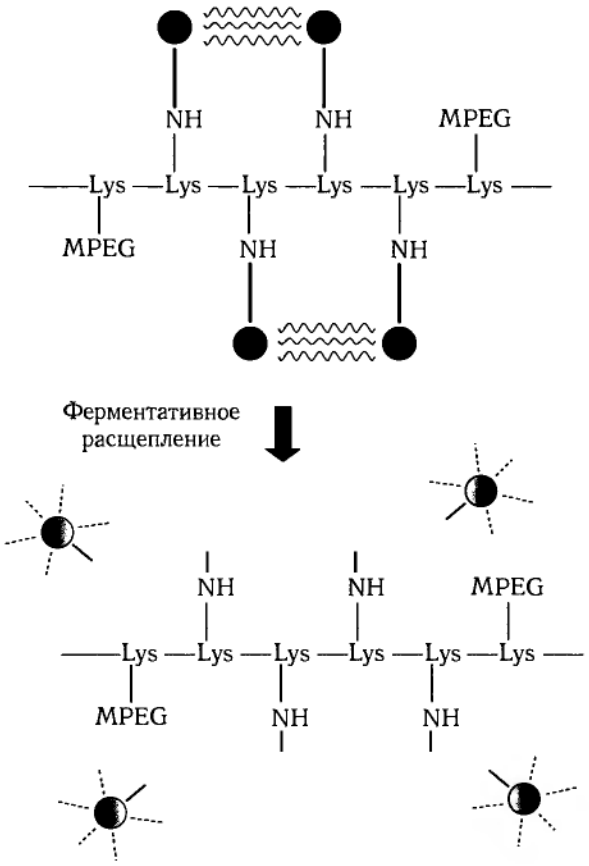


Рис. 16.2. Механизм активации флуоресцентного зонда (V. Ntziachristos, C. Bremer, R. Weissleder, 2003)

В частности, была продемонстрирована возможность молекулярной визуализации активности катепсина В — лизосомальной цистеиновой протеазы [10]. Метод основан на том, что катепсин В макрофагов атеросклеротических бляшек, расщепляя специфический пептидный субстрат, активирует флуоресцирующую способность контрастного средства [11]. После введения активируемого зонда мышам с врождённым дефицитом аполипопротеина Е (apoE) удалось измерить флуоресценцию зонда *in vivo*. Через 24 ч были обнаружены субмикромолярные концентрации зонда, преобразованного ферментом (рис. 16.3, цветная вклейка). Размеры зон, испускающих флуоресцентный сигнал от участков аорты у животных с дефицитом apoE (аорта контрольных животных не флуоресцировала), хорошо коррелировали по локализации с липидными областями, окрашенными суданом IV (рис. 16.4, цветная вклейка). Следовательно, увеличение активности катепсина В может служить биомаркёром воспаления атеросклеротических поражений.

Увеличение активности катепсина В наблюдается также и во многих опухолях. Была замечена корреляция между прогрессией опухоли, её агрессивным поведением и повышенным содержанием фермента. На рис. 16.5 (цветная вклейка) показана мышь *nude* с имплантированной в грудную клетку фибросаркомой HT1080 (10^5 клеток). Через 7–10 дней после имплантации мыши внутривенно был введён флу-

оресцентный активируемый зонд, специфичный к катепсину B, и *in vivo* измерен флуоресцентный сигнал. Подобный эксперимент был проведён на мышах nude с имплантированной карциномой лёгкого человека, через 24 ч после внутривенного введения флуоресцентного активируемого зонда, специфичного к катепсину B, *in vivo* был измерен флуоресцентный сигнал, выявивший очаг опухоли, который абсолютно совпал с её морфологической локализацией [4, 5, 12].

Естественно, выбор оптимального времени измерения после инъекции будет зависеть от визуализируемого фермента, конкретного заболевания и его особенностей, способа введения контрастного средства, аппаратного обеспечения.

Также на мышах *in vivo* была показана возможность применения катепсина D в качестве маркёра заболевания, повышение уровня которого свидетельствует о более высоком метастатическом потенциале рака молочной железы [6].

Тканевые металлопротеиназы (MMP, или матриксины) играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития основного вещества тканей, при онкогенной трансформации клеток и ангиогенезе. При атеросклерозе MMP, синтезируемые макрофагами с пенистой цитоплазмой, активированными Т-лимфоцитами, гладкомышечными клетками и сосудистым эндотелием под действием различных цитокинов (интерферон-γ, фактор некроза опухолей, интерлейкин-1), активно разрушают атеросклеротические бляшки посредством ферментативного расщепления покрышки атеросклеротической бляшки или подэндотелиальной мембраны [13, 14]. Недавно была продемонстрирована возможность молекулярной визуализации активности желатиназы (MMP-2) и её терапевтического ингибирования *in vivo* с помощью средств флуоресцентной визуализации. Используя модель MMP-2-положительной человеческой фибросаркомы, было получено 3-кратное увеличение флуоресцентного сигнала от клеток опухоли после введения контрастного вещества. MMP-2-специфичный ингибитор подавлял интенсивность флуоресценции. Таким образом, флуоресцентная визуализация активности MMP-2 может помочь в диагностике дестабилизации покрышки атеросклеротической бляшки [10].

Тромбин — сериновая протеаза, фермент, широко вовлечённый в нормальные и патологические процессы, включая тромбогенез, эмбриогенез, ангиогенез [15]. Тромбин гидролизует пептидные связи фибриногена с образованием нерастворимых мономеров фибрина, которые спонтанно ассоциируют в регулярные зигзагообразные структуры, в результате образуется нерастворимый полимерный фибриновый сгусток. Сгусток захватывает эритроциты, тромбоциты, другие компоненты крови, и таким образом образуется тромб. Функция тромбина, помимо превращения фибриногена в фибрин, заключается в переводе фактора XIII в его активную форму ($XIII_a$). Фактор $XIII_a$ сшивает мономеры фибрина путём образования специфической изопептидной связи, такая стабилизация фибринового сгустка способствует его ретракции. Визуализируя *in vivo* активность фибрина, можно оценивать роль тромбина в гомеостатических и патологических процессах и проводить поиск адекватной фармакотерапии. В ряде работ продемонстрирована возможность молекулярной визуализации тромбина *in vivo* с помощью флуоресцентных методов. Крысам со смоделированным тромбозом был введён флуоресцентный активируемый зонд, специфичный к тромбину, и *in vivo* измерен флуоресцентный сигнал [5–8, 16] (рис. 16.6, цветная вклейка). Уже через час после введения флуоресцентного зонда в ветви бедренной вены крысы визуализировались микротромбы, локализация которых совпадала с расположением тромботических отложений, выявленных с помощью $FeCl_3$. Таким образом, флуоресцентная визуализация активности тромбина может помочь в диагностике раннего тромбоза и выявлении локализации тромбов.

Такой подход к визуализации маркёров (определённых ферментов) заболевания позволит быстро, точно, безболезненно, в реальном масштабе времени и, главное, гораздо раньше его диагностировать.

16.3. Визуализация лизосом

Для понимания механизмов развития того или иного заболевания и, возможно, его диагностики важна визуализация не только ферментов, вовлечённых в патологический процесс, но и структур, ответственных за их синтез и деградацию.

Возможность визуализации клеточных органелл была показана на лизосомах 4 линий эпителиальных клеток молочной железы (HMECs — Human Mammary Epithelial Cells), находящихся на разных стадиях малигнизации. Лизосомальные ферменты имеют оптимум pH около 4,5–5,0, т. е. в кислой области. При pH, близких к нейтральным, характерным для цитоплазмы, эти ферменты обладают низкой активностью. Очевидно, это служит механизмом защиты клеток от самопереваривания в том случае, если фермент лизосом попадёт в цитоплазму. Микроокружение же опухоли, находящейся в условиях гипоксии, часто характеризуется низким значением pH, что приводит к активации ферментов лизосом вне органелл, деградации клетки и внеклеточного матрикса, способствуя метастазированию.

Визуализация лизосом и оценка их функциональной активности в раковых клетках была бы чрезвычайно полезна для понимания механизмов развития опухоли и метастазов. Как известно, маркёрами лизосом являются белки LAMP-1 (CD 107a, lgp110) и LAMP-2 (CD 107b, lgp120). Для определения оптимальной концентрации синтезированного зонда — 5-амино-3,4,6-тригидрокситетрагидропиран-2-илметилового эфира 5-диметиламинонафтален-1-сульфоновой кислоты (6-*O*-dansyl-GlcNH_2), реагирующего с разветвлёнными олигосахаридными остатками LAMP-1,2 (Lysosome-Associated Membrane Proteins), культуру клеток HMEC инкубировали с различными его концентрациями в течение 5 дней, определяя жизнеспособность и флуоресценцию культуры каждые 24 ч. Концентрация зонда 500 мкМ оказалась оптимальной: интенсивность флуоресценции дансильной группы при меньшей концентрации зонда была недостаточной, большие концентрации были токсичными. Затем культуры HMECs инкубировали с 500 мкМ 6-*O*-dansyl-GlcNH_2 в течение 5, 10, 22, 36, 60, 94 и 120 ч. Оптимальное время инкубации — 94–120 ч. Для подтверждения специфичности 6-*O*-dansyl-GlcNH_2 по отношению к олигосахаридам лизосомальных белков LAMP-1,2 лизосомы выделяли в изопикническом градиенте плотности и после проведения вестерн-блоттинга измеряли флуоресценцию меченых антител к синтезированному зонду.

Для оценки взаимодействия зонда с маркёром лизосом в фиксированных клетках одновременно измеряли флуоресценцию дансильной группы и флуоресценцию меченых антител к LAMP-1,2 (рис. 16.7, цветная вклейка). Затем измеряли флуоресцентный сигнал уже живых культур HMEC (инкубированных в течение 94 ч с 500 мкМ зонда), находящихся в постоянно перфузируемой камере. Результаты экспериментов в живых и фиксированных клетках всех четырёх линий были сходными, что свидетельствует о специфичности химического зонда 6-*O*-dansyl-GlcNH_2 к маркёрам лизосом LAMP-1,2 и возможности флуоресцентной визуализации лизосом *in vivo* с помощью данного зонда [17]. По нашему мнению, данный подход к визуализации лизосом может не только помочь в изучении механизмов развития опухоли и метастазов, но и оказаться полезным в диагностике онкологических заболеваний и стадии опухолевого роста.

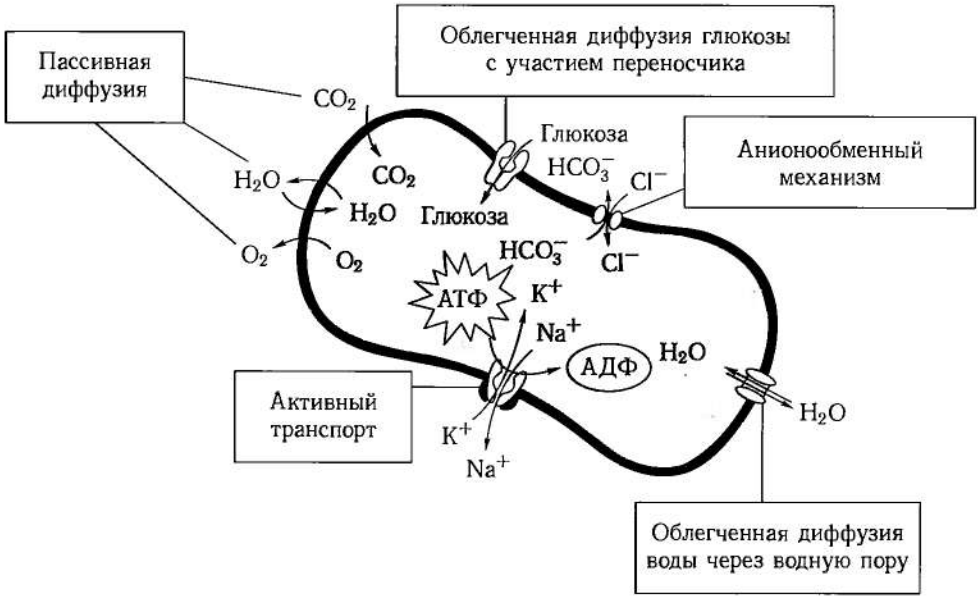
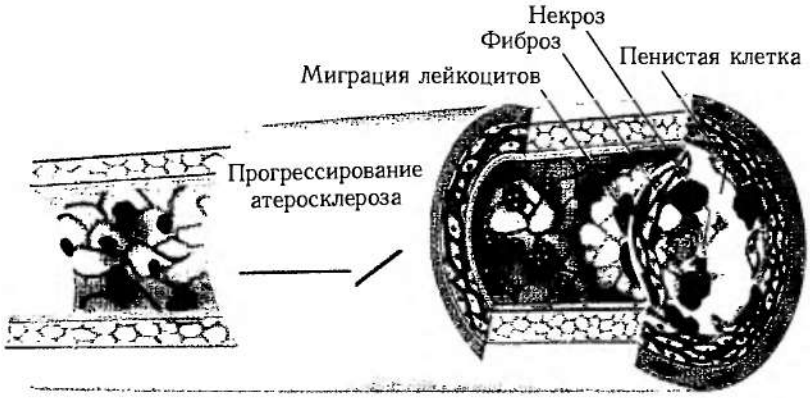


Рис. 2.2. Пути миграции веществ через плазматическую мембрану



Атерогенез | Атеросклероз

Ранняя ЗГТ	Поздняя ЗГТ
⬆ Вазодилятация	⬇ Экспрессия эстрогенных рецепторов
⬇ Воспаление	⬇ Вазодилятация
⬇ Прогрессирование заболевания	⬆ Воспаление
	⬆ Нестабильные бляшки

Рис. 9.3. Влияние эстрогенов на сосудистые и кровяные клетки

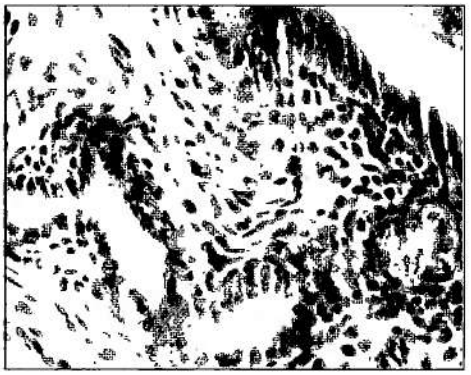


Рис. 9.4. Фаза секреции эндометрия

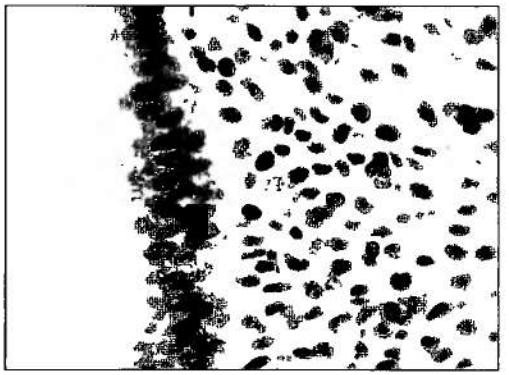


Рис. 9.5. Фаза пролиферации эндометрия

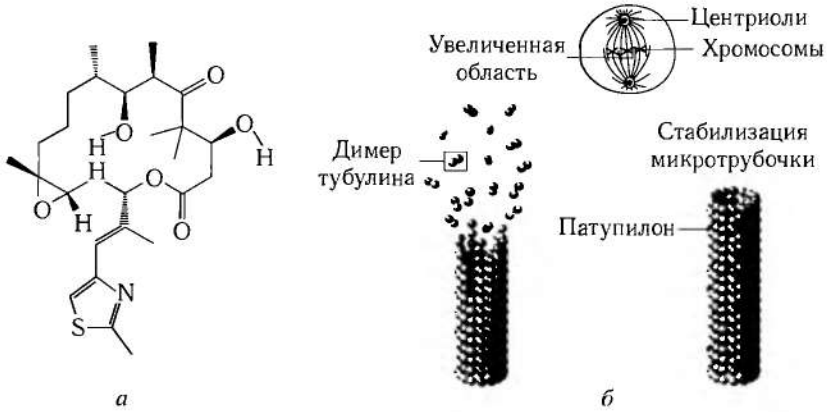


Рис. 11.13. Химическая структура (*а*) и схема действия (*б*) патупилона

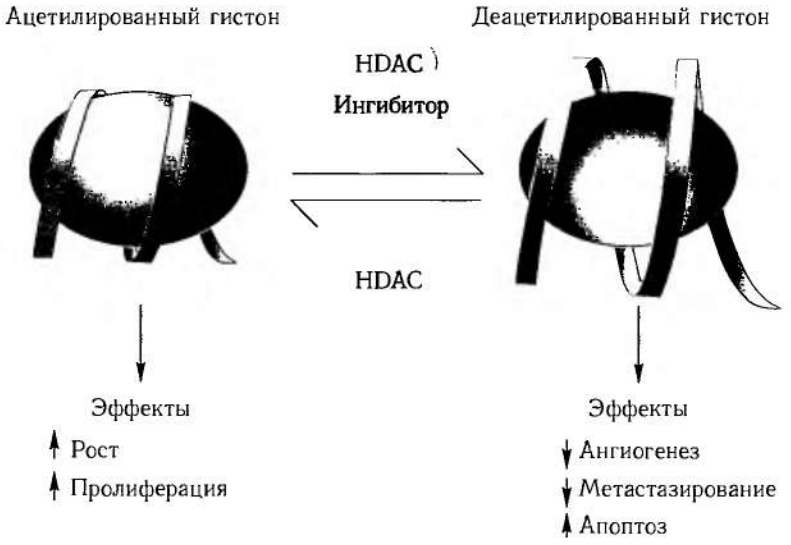


Рис. 11.26. Схема механизма действия ингибиторов HDAC

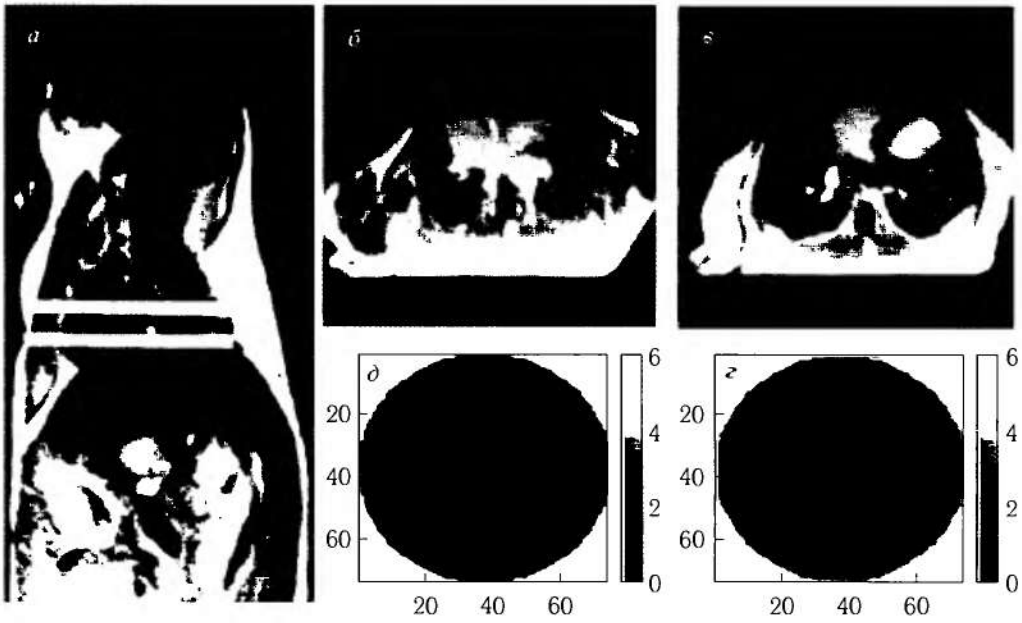


Рис. 16.3. Флуоресцентная молекулярная визуализация атеросклеротических повреждений аорты мыши с дефицитом apoE *in vivo*: *а* — сагиттальное изображение аорты; с помощью магнитного резонанса, зелёным показаны уровни поперечных срезов аорты, изображённые на *б* и *в*; *б*, *в* — красные стрелки указывают на атеросклеротические повреждения, выявленные с помощью магнитного резонанса; *г*, *д* — соответствующие *б* и *в* зоны повреждения, выявленные с помощью флуоресцентной томографии (FMT) при использовании зонда, расщеплённого катепсином B (J. Chen и др., 2002).

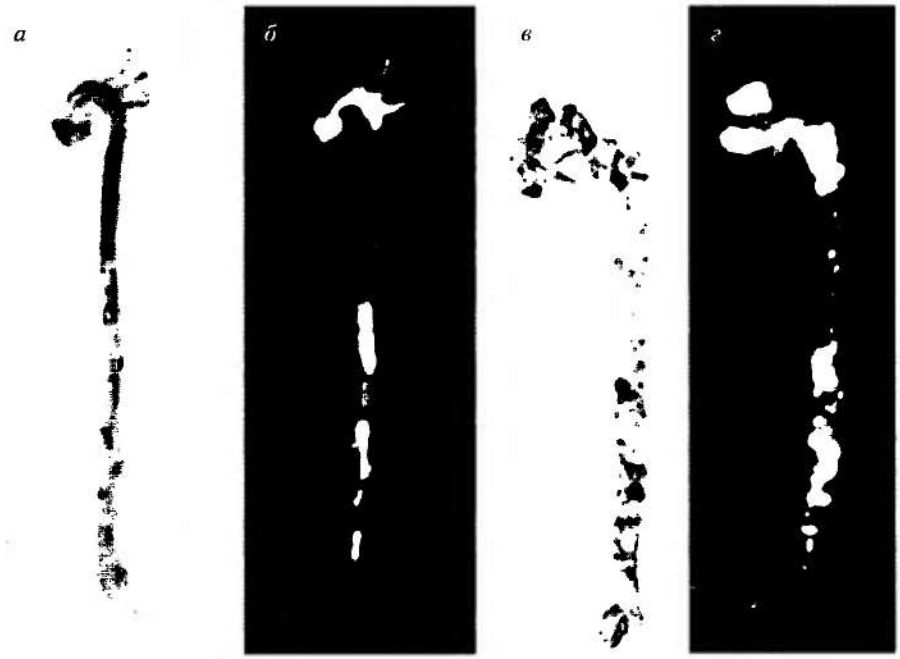


Рис. 16.4. Флуоресцентная молекулярная визуализация атеросклеротических повреждений аорты мыши с дефицитом apoE *in vivo*: *а*, *б* — выделенная аорта; *в*, *г* — выделенная аорта, рассечённая вдоль; *а* — фотография выделенной аорты, неповреждённые области заполнены кровью — тёмно-красные участки, зоны атеросклеротических повреждений — белые участки; *б* — выявленные с помощью флуоресцентного зонда, расщеплённого катепсином В, атеросклеротические повреждения в дуге аорты и брюшной части аорты (FRI); *в* — фотография выделенной аорты, рассечённой вдоль (зоны повреждения выявлены окраской суданом IV — красные участки); *г* — соответствующие *в* зоны повреждения в рассечённой вдоль аорте, выявленные с помощью флуоресцентного зонда, расщеплённого катепсином В (FRI) (J. Chen и др., 2002).

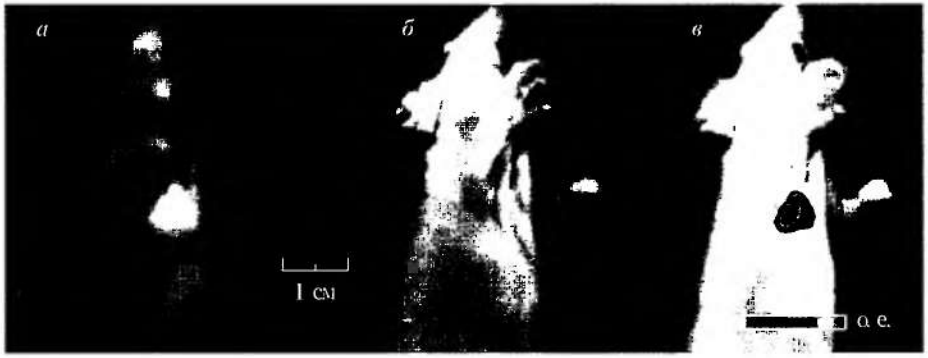


Рис. 16.5. Флуоресцентная молекулярная визуализация фибросаркомы мыши nude *in vivo*: *а* — изображение мыши с помощью FRI, хорошо различим флуоресцирующий очаг опухоли, контуры животного нечёткие; *б* — обычное изображение мыши, очаг опухоли не визуализируется. *в* — суперпозиция и компьютерная обработка *а* и *б*, чёткое изображение мыши и очага опухоли (V. Ntziachristos, C. Bremer, R. Weissleder, 2003)

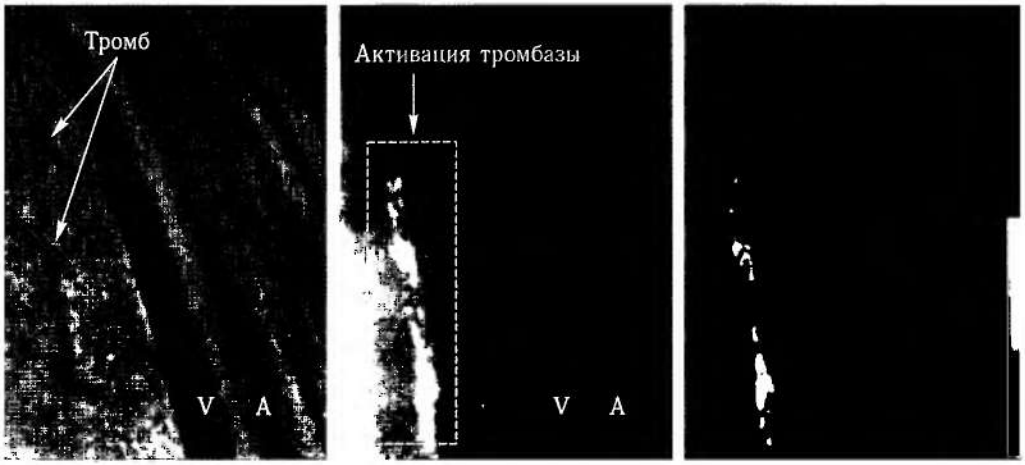


Рис. 16.6. Флуоресцентная молекулярная визуализация активности тромбина при тромбозе у крысы *in vivo*: *а* — тёмные образования — тромботические отложения в ветви бедренной вены крысы, различимые при введении $FeCl_3$ уже через 60 мин после их формирования; *б* — тромботические отложения в ветви бедренной вены крысы, визуализируемые с помощью флуоресцентного зонда, специфичного к тромбину; *в* — суперпозиция и компьютерная обработка *а* и *б*, высокий флуоресцентный сигнал от микротромбов, детектируемый через 60–90 мин после введения флуоресцентного зонда, специфичного к тромбину (флуоресцентная микроскопия *in vivo*). A — артерия, V — вена (F. A. Jaffer, C. H. Tung, R. E. Gerszten, R. Weissleder, 2002).

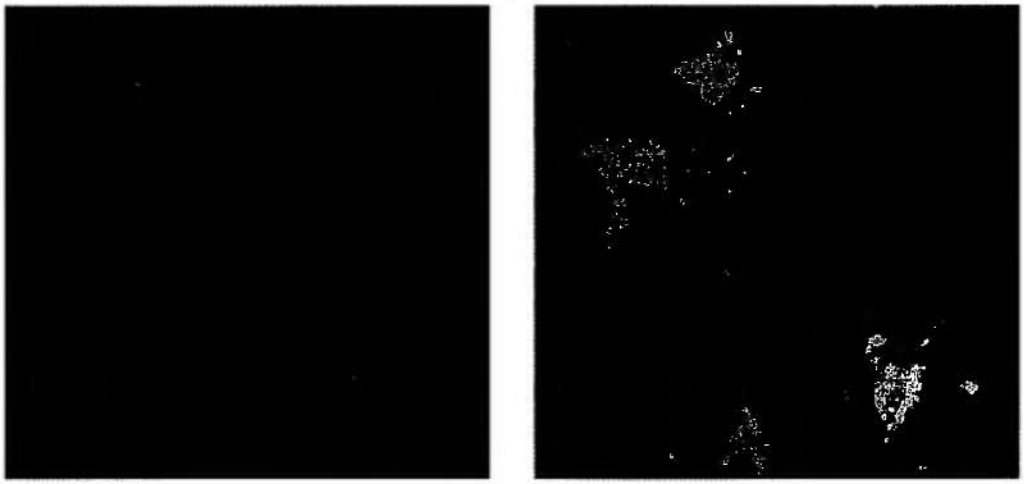


Рис. 16.7. Красные области — флуоресценция меченых антител к LAMP-1,2; зелёные области — флуоресценция дансильных групп в культурах HMECs (флуоресцентный микроскоп) (K. Glunde, S. E. Guggino, Y. Ichikawa, Z. M. Bhujwalla, 2003)

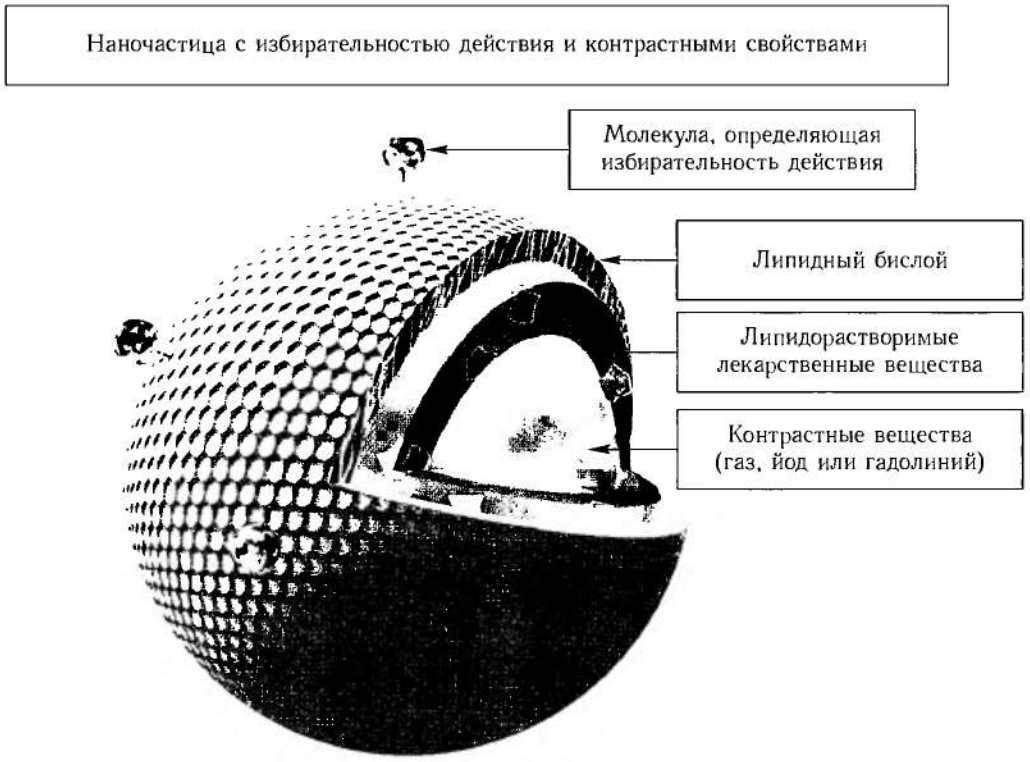


Рис. 17.1. Липидная наночастица, позволяющая одновременно обеспечивать избирательность накопления за счёт поверхностных молекул, перенос нужных лекарственных средств в клетки-мишени и контрастность изображения в месте своего нахождения, иными словами, выполнять одновременно три функции

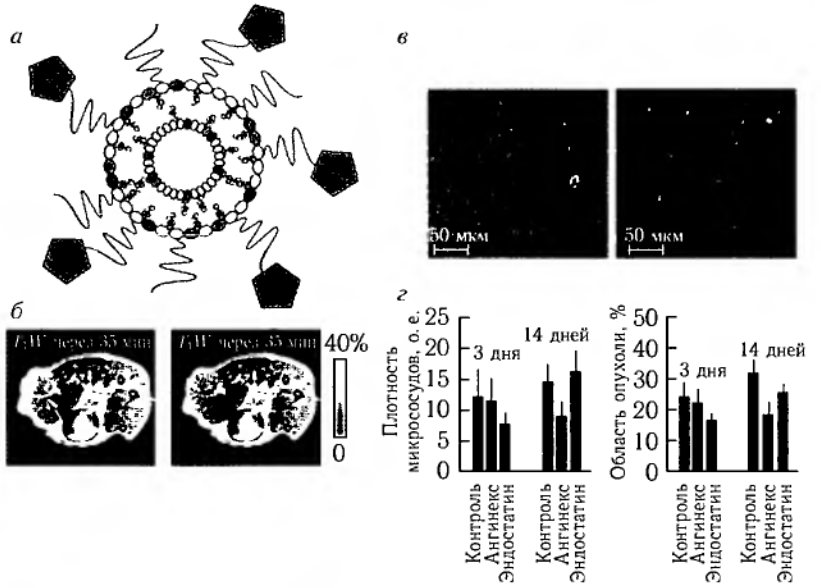


Рис. 17.2. Количественная молекулярная визуализация васкуляризации опухоли с помощью RGD-липосом: *а* — липосомы состоят из липидов (жёлтые), флуоресцирующих липидов (зелёные), амфифильных парамагнетиков (пурпурные) и конъюгированных пептидов RGD (зелёные пятиугольники); *б* — МР-визуализация опухоли у животных после введения данных липосом; на T_1-взвешенном МРТ-изображении наблюдается увеличение сигнала в области опухоли в 3 раза и формирование опухолевого кольца (стрелка); *в* — флуоресцентная микроскопия DAPI-окрашенных 10-микронных срезов опухоли после введения указанных липосом в сравнении с гистологией микрососудов; *г* — видно выраженное контрастирование опухоли на МРТ после введения $\alpha v\beta 3$-меченных молекул; двум группам мышей вводили ангинекс и эндостатин (ингибиторы ангиогенеза) в течение 3 или 14 дней, а третья группа мышей была контрольная (W. J. Mulder, A. W. Griffioerr, G. J. Strijers и др., 2007)

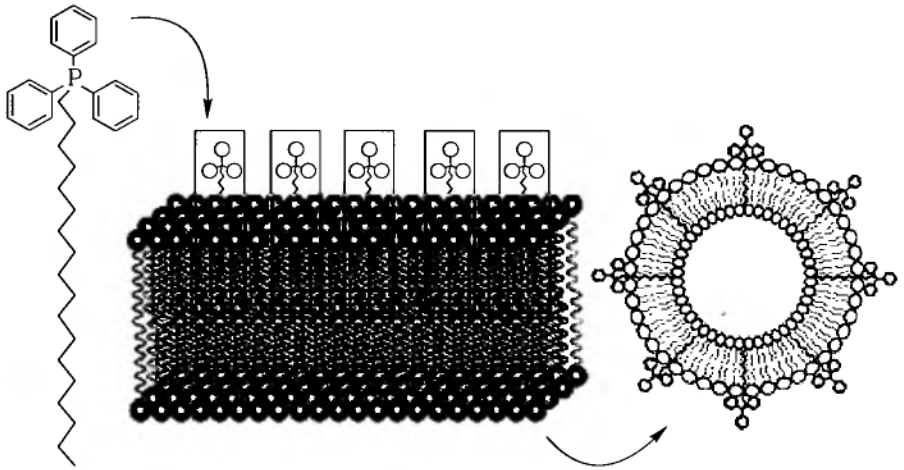


Рис. 17.3. Нанолипидные везикулы (липосомы), имеющие тропность к митохондриям благодаря присутствию трифенилфосфониевых катионов

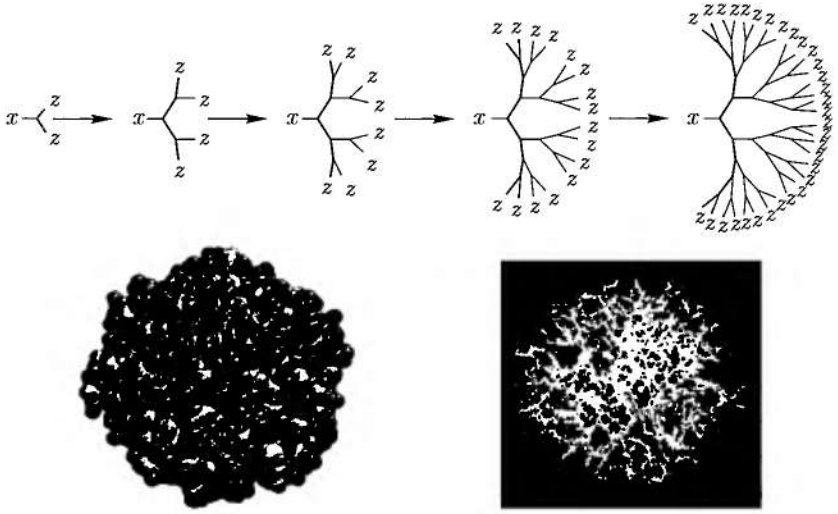


Рис. 17.5. Сборка дендримера из ветвистой молекулы Z–X–Z (вверху) и различные виды изображений дендримеров (внизу)

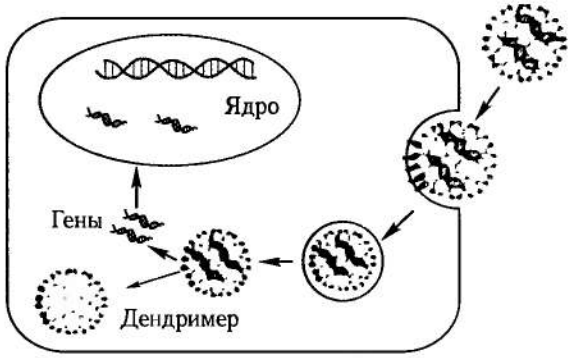


Рис. 17.6. Дендримеры как переносчики генов

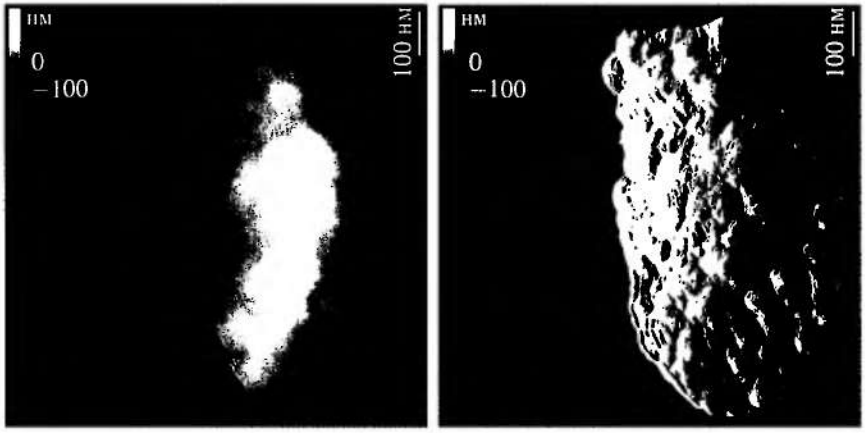


Рис. 17.8. Изображение наночастицы с помощью атомной силовой микроскопии

16.4. Заключение

Таким образом, флуоресцентные методы молекулярной визуализации имеют очень большой потенциал роста в области диагностики опухолей и атеросклеротических повреждений, получения прижизненной информации о биохимическом составе и анатомическом (морфологическом) строении обследуемого участка мягких тканей тела пациента [1]. Тенденции развития рассмотренных флуоресцентных методов молекулярной визуализации позволяют надеяться на скорейшее решение таких проблем медицины, как причины возникновения заболеваний, их ранняя диагностика и объективизация эффективности лечения.

Сдерживание развития флуоресцентной визуализации в медицине связано, прежде всего, с рядом нерешённых вопросов технического характера. Кроме чисто аппаратных средств, она требует разработки серьёзных программных алгоритмов обработки и анализа диагностической информации, длительной разработки практических методик её применения в тех или иных клинических ситуациях и разделах медицины. Для достоверного подтверждения результатов диагностики необходимо проведение дорогостоящих и длительных по времени клинических научных исследований. Однако принципиально неразрешимых вопросов на пути развития этого диагностического направления сегодня уже нет. Тенденции развития рассмотренных флуоресцентных методов молекулярной визуализации позволяют надеяться на скорейшее решение таких проблем медицины, как причины возникновения заболеваний, их ранняя диагностика и объективизация эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 16

1. *Рогаткин Д.А.* Неинвазивные оптические диагностические технологии для медицины. — М.: Лазер-Информ, 2003. № 23(278). С. 2–8.
2. *Баранов В.Ю.* Изотопы: свойства, получение, применение. — М.: Физматлит, 2005. — 1328 с.
3. *Владимиров Ю.А.* Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 6. С. 25–32.
4. *Ntziachristos V., Bremer C., Weissleder R.* Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging // Eur. Radiol. 2003. V. 13. P. 195–208.
5. *Weissleder R., Tung C.H., Mahmood U., Bogdanov A.* In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. P. 375–378.
6. *Tung C., Mahmood U., Bredow S., Weissleder R.* In vivo imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter // Cancer Res. 2000. V. 2000. P. 4953–4958.
7. *Bremer C., Tung C.H., Weissleder R.* In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition // Nat. Med. 2001. V. 7. P. 743–748.
8. *Jaffer F.A., Tung C.H., Gerszten R.E., Weissleder R.* In vivo imaging of thrombin activity in experimental thrombi with thrombin-sensitive nearinfrared molecular probe // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002. V. 22. P. 1929–1935.
9. *Shah K., Tung C.H., Chang C.H., Slootweg E., O'Loughlin T., Breakefield X.O., Weissleder R.* In vivo imaging of HIV protease activity in amplicon vector transduced gliomas // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 273–278.
10. *Jaffer F.A., Weissleder R.* Seeing Within: Molecular Imaging of the Cardiovascular System // Circ. Res. 2004. V. 94. P. 443–445.
11. *Chen J., Tung C.H., Mahmood U., Ntziachristos V., Gyurko R., Fishman M.C., Huang P.L., Weissleder R.* In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis // Circulation. 2002. V. 105. P. 2766–2771.
12. *Mahmood U., Tung C.H., Bogdanov A.Jr., Weissleder R.* Near-infared optical imaging of protease activity for tumor detection // Radiology. 1999. V. 213. P. 866–70.
13. *Libby P.* Inflammation in atherosclerosis // Nature. 2002. V. 420. P. 868–874.
14. *Galis Z.S., Khatri J.J.* Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly // Circ. Res. 2002. V. 90. P. 251–262.
15. *Coughlin S.R.* Thrombin signalling and protease-activated receptors // Nature. 2000. V. 407. P. 258–264.
16. *Tung C.H., Gerszten R.E., Jaffer F.A., Weissleder R.* A novel near-infrared fluorescence sensor for detection of thrombin activation in blood // Chembiochem. 2002. V. 3. P. 207–211.
17. *Glunde K., Guggino S.E., Ichikawa Y., Bhujwalla Z.M.* A Novel Method of Imaging Lysosomes in Living Human Mammary Epithelial Cells // Molecular Imaging. 2003. V. 2, № 1. P. 24–36.

Глава 17
НАНОФАРМАКОЛОГИЯ

Нанотехнологии определяют как совокупность приёмов и методов, применяемых при создании, изучении, производстве и использовании наноструктур (размер около 1–700 нм) с новыми химическими, физическими, биологическими свойствами [1]. Поскольку нанотехнологии помогают создавать новые соединения и структуры, то они имеют особую привлекательность для фармакологии, основной задачей которой является поиск новых высокоэффективных лекарственных средств. Сами по себе нанотехнологии основаны на взаимопроникновении различных областей науки — химии, физики, биологии, медицины, генетики, материаловедения, информатики и др.

История нанонауки начинается с лекции Р. Фейнмана, прочитанной в канун 1960 г. Прежде всего Фейнман обратил внимание на чудеса биологических систем (клетки), говоря об огромной плотности записи информации в этих системах и о сложных процессах обработки информации. Фейнман говорил о миниатюризации компьютеров, возможности создания наноструктур путём постепенного уменьшения их элементов, возможности манипулирования отдельными атомами, о перспективах работы с квантовыми уровнями энергии. Один из идеологов нанотехнологии К. Э. Дрекслер (1986) рассматривал идеи молекулярных вычислений, идеи самосборки наноконструкций, нанокомпьютеров, а также большое количество идей применения нанотехнологии в науке о материалах, космосе, медицине, экологии. В настоящее время большая часть сверхминиатюрных устройств создаётся при помощи технических, а не биологических принципов. При дальнейшем уменьшении систем наделение их необходимой функциональностью будет затруднено, в то время как в биологических системах многие технические задачи успешно решаются при помощи молекулярных систем, функционирование которых основано на принципах конформационных изменений и молекулярного узнавания. Можно ожидать создания гибридных наномеханических объектов на основе биологических систем и неорганических устройств.

О нанотехнологиях вначале стали говорить в области материаловедения и микроэлектроники. При создании новых лекарственных веществ и объяснении их механизма действия фармакологи уже давно работают на молекулярном, иногда даже субмолекулярном уровне, т. е. с молекулами размером менее 1 нм и их электронными облаками, приближаясь к квантовой фармакологии. Поэтому сегодняшний интерес к нанотехнологиям в фармакологии связан не столько с геометрическими размерами, сколько с новыми способами получения и использования лекарственных средств с помощью методов нанотехнологии. Причём эти методы могут носить как прикладной характер, как, например, методы получения липосомальных лекарственных форм или микронизированных лекарственных форм, так и поисковый характер, что гораздо интереснее, поскольку относится к области пока ещё не апробированных междисциплинарных методов создания потенциальных лекарственных средств с принципиально новыми видами биологической активности [2].

Размер клетки человека 7–20 мкм, диаметр двойной спирали ДНК, основной информационной макромолекулы — 2,4 нм. Поэтому диапазон «нано» в медицине

и биологии существенно отличается от физического «нано». (Физики считают наночастицами частицы такого размера, для которого начинают проявляться квантовые эффекты, т. е. менее 10 нм.)

Согласно разъяснениям The European Science Foundation (ESF) в 2005 г. «наномедицина» — это пять перекрывающихся разделов.

1. Аналитические методики и инструменты для диагностики *ex vivo*, использующие нанонауку.

2. Визуализация нанообъектов (ранняя диагностика, например опухолевых заболеваний, болезни Альцгеймера).

3. Химические технологии, которые создают наноматериалы и наномашины.

4. Нанолекарства для лечения болезней, включая биологически активные вещества и системы доставки лекарств.

5. Переход от лабораторных образцов к промышленному производству готовых лекарственных форм, после аттестации наноматериалов, их стандартизации, проверки безопасности и эффективности.

Понятно, что наиболее быстрые и эффективные результаты наномедицины могут быть достигнуты в области нанофармакологии, т. е. при создании новых лекарственных средств с использованием методов нанотехнологии. Полученный в этой области опыт позволяет декларировать основную задачу, которая может быть решена в фармакологии с помощью нанотехнологий: контейнерная доставка лекарственных и диагностических субстанций в нужное место.

Её решение предполагает выяснение многих процессов, происходящих на молекулярном уровне, таких как:

— разработка биосовместимых наночатиц в качестве носителей лекарственных и диагностических субстанций или наночастиц с регулируемой биодоступностью;

— поиск клеток-мишеней (направленный транспорт);

— доставка к ним субстанции для лечения или обнаружения (в случае диагностики) особых состояний;

— проникновение в клетки-мишени (прохождение барьеров);

— транспорт к определённым компартментам клетки (ядро, митохондрии и др.);

— выгрузка содержимого (контролируемое высвобождение);

— разборка на безвредные части (биосовместимость).

Направленный транспорт самым простым способом может определять размер наночастиц. При размере более 25–30 нм они избирательно поглощаются естественными мишенями в организме: клетками моноцитарно-макрофагальной системы (их также называют клетками ретикуло-эндотелиальной системы, РЭС). Это фагоциты; их основная функция — поглощать бактерии и вирусы, чтобы разрушать эти чужеродные агенты, а их части представлять на своей поверхности для формирования иммунного ответа. Особенно хорошо они поглощают опсонизированные частицы — частицы, на поверхности которых адсорбированы опсонины (белки плазмы крови), потому что клетки РЭС имеют рецепторы к опсонинам. Указанное свойство наночастиц используют при конструировании вакцин. Так как клетки РЭС являются антигенпредставляющими, то загрузка наночастиц антигеном болезнетворного микроорганизма (вируса или бактерии) приводит к избирательной доставке этого антигена в антигенпредставляющую клетку естественным путём. Этот приём очень эффективен: на фармацевтическом рынке представлено несколько липосомных вакцин для людей и домашних животных.

Другая область, в которой может быть использовано указанное свойство — лечение внутриклеточных инфекций. Некоторые бактерии (возбудители туберкулёза, болезни легионеров, проказы и т. п.) после поглощения их макрофагами включают специфические механизмы внутри макрофага, которые предохраняют их от перева-

ривания. Таким образом, они прячутся и от иммунной системы, и от лекарственных веществ. Введение в организм наночастиц, загруженных антибиотиками, способствует доставке лекарственного вещества в макрофаги, где скрываются бактерии, что существенно улучшает эффективность противомикробной терапии.

В то же время в ряде случаев поглощение клетками РЭС наночастиц ограничивает их возможность достигнуть клеток-мишеней. Чтобы противодействовать этому, был найден способ существенно уменьшить поглощение макрофагами наночастиц путём присоединения к их поверхности гибких полимерных цепей. Это существенным образом затрудняет опсонизацию наночастиц. В результате время циркуляции таких стерически стабилизированных частиц увеличивается на порядок. Возрастание продолжительности циркуляции наночастиц в организме даёт возможность проявиться эффекту пассивного нацеливания в значительно большей степени. Был создан первый препарат на основе стерически стабилизированных липосом, загруженных доксорубицином — Доксил.

Для улучшения поглощения наночастиц клетками к ним присоединяют транслоцирующие пептиды (как правило, фрагменты некоторых вирусов) — такие конъюгаты легко проходят через плазматическую мембрану с помощью макропиноцитоза. Было обнаружено, что вещества, загруженные в наночастицы (липосомы, полимерные наносферы), попадают в мозг намного эффективней, чем из раствора. В частности, показано, что накопление ДОФА (лекарственной субстанции для лечения болезни Паркинсона) в полосатом теле головного мозга в 100 раз больше из липосом, чем из раствора. Этот факт можно объяснить тем, что некоторые наночастицы сорбируют на своей поверхности белковую часть липопротеинов низкой плотности, для которых на клетках эндотелия капилляров мозга есть рецепторы, обеспечивающие трансцитоз — проникновение через эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера.

Если прикладные вопросы использования нанотехнологий в фармакологии достаточно хорошо описаны (они уже разрабатываются несколько десятилетий), то поисковые работы с помощью методов нанотехнологии находятся в самом начале своего развития и представляют наибольший интерес. С нашей точки зрения в фармакологии такие поисковые работы могут дать наиболее быстрые результаты в нескольких классах наночастиц: липосомах, фуллеренах, дендримерах и металлах. При этом существенное внимание уделяется фосфолипидным наночастицам, вклад в эффективность действия которых, помимо биологических свойств, вносят размеры.

17.1. Наночастицы в виде липидных везикул — липосом

Фармакология уже имеет в своём арсенале наночастицы, которые содержат лекарственные средства и могут доставлять их в клетки. Эти частицы представляют собой липосомы — сферические двухслойные мембраны, содержащие внутри лекарственные вещества. История липосом начинается с 1960-х гг. XX века, когда английский учёный Алек Бэнгхем (A. D. Bangham) вместе с коллегами, проводя исследования поведения фосфолипидов в водных средах, на электронных микрофотографиях увидел слоистые частицы, похожие на мембранные структуры клетки. Дальнейшие исследования показали, что неорганические ионы, присутствующие в растворе, включаются внутрь этих частиц и удерживаются там длительное время. Так впервые было установлено, что фосфолипиды, являющиеся основными компонентами клеточных мембран, способны самопроизвольно образовывать в воде замкнутые мембранные оболочки, которые захватывают часть окружающего водного раствора, а образующая их фосфолипидная мембрана обладает свойствами полупроницаемого барьера. Самое важное для фармакологов то, что липосомы способны самопроизвольно заключать в себя среду, в которой они находятся, и переносить заключённые в них молекулы

химических соединений. Фармакотерапевтические преимущества липосом обусловлены рядом факторов, среди которых природная биосовместимость материала липосом, избирательность депонирования относительно клеток, находящихся в состоянии гипоксии, возможность регулировать липидный состав липосом и тем самым изменять их фармакокинетику и фармакодинамику. Самые распространённые молекулы, с помощью которых можно регулировать аккумуляцию липосом, — это семейство интегринов, значительная часть которых расположена на эндотелии, выстилающем внутреннюю поверхность сосудов. Благодаря интегринам циркулирующие везикулы «узнают», где им нужно остановиться и прикрепиться, а также при необходимости выйти из сосуда в ткани.

Липосомальные системы следует рассматривать не только как носители лекарственных средств, но и как самостоятельные факторы фармакокоррекции патологических состояний. На основе липосом был создан антигипоксически-антиоксидантный препарат Липин. Механизм действия липосом, возможно, заключается в модификации фосфолипидного окружения ионных каналов, мембранных рецепторов и ферментов: если оно меняется, то, соответственно, меняется и их активность. Меняя липидный состав липосом, можно направленно изменять их фармакологические эффекты.

Использование липосом для транспорта и целенаправленной доставки противоопухолевых препаратов стало одним из перспективных направлений в онкологии. Как известно, применение цитостатиков сопровождается токсическими осложнениями, обусловленными поражением быстрообновляющихся, с высоким темпом пролиферации клеток кроветворных и иммунокомпетентных органов (в первую очередь — клеток костного мозга, эпителия желудочно-кишечного тракта, сердечной мышцы, почек и др.). Кроме того, незначительное непосредственное влияние на опухолевый рост также ограничивает использование цитостатиков в свободном виде. Данные, накопленные специалистами за последние годы, подтверждают способность липосом транспортировать лекарственное средство, модифицировать терапевтический эффект и снижать определённые типы токсического действия. Однако оказалось, что у липосомальных препаратов появляются другие типы токсических эффектов, например эритемы и ландонно-подошвенного синдрома.

Специалисты многих стран мира работают над созданием готовых лекарственных форм цитостатиков, инкапсулированных в липосомы. Уже внедрён в клинику липосомальный доксорубицин, представляющий собой липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, величиной около 100 нм в диаметре и содержащий доксорубицин: Доксил (Sequues Pharmaceutical, США). Другой пример — это липосомы, состоящие из яичного высокоочищенного фосфатидилхолина, величиной около 150 нм в диаметре, содержащие доксорубицин Келикс, Caelyx (Shering Plough, США). Липосомальный доксорубицин имеет более низкий клиренс по сравнению с чистым доксорубицином, что позволяет дольше поддерживать достаточную его концентрацию в сыворотке. Инкапсулированный в липосомы препарат также характеризуется лучшей способностью накапливаться в опухолевых тканях. Проведённый мета-анализ предыдущих исследований показал активность доксорубицина при эпителиальном раке яичников. Данное исследование было предпринято для оценки эффективности липосомального доксорубицина при раке яичников, резистентном к препаратам платины и паклитакселу.

Фармакотерапевтические преимущества липосом обусловлены рядом факторов, среди которых природная биосовместимость материала липосом, избирательность депонирования относительно клеток, находящихся в состоянии гипоксии, регулируемая органотропность. Лекарственные вещества в форме фосфолипидных наночастиц обладают высокой биодоступностью и эффективностью. В ГУ НИИ биомедицинской

химии была создана лекарственная форма на основе фосфолипидных наночастиц — Фосфоглив для лечения заболеваний печени. Фосфолипидные наночастицы образуются в процессе расширения струи фосфолипидной эмульсии в сопле, формируемой за счёт газовой бомбы с давлением 1500 атм. Затем производится ультрафильтрация, стерилизация, лиофилизация и упаковка препарата. Размеры полученных наночастиц контролируются на атомно-силовом микроскопе и соответствуют размерам 10–50 нм Препарат, предназначенный для лечения заболеваний печени различной этиологии, показал свою высокую эффективность и может использоваться для лечения острых и хронических вирусных гепатитов А, В и С. Следует отметить, что инъекционная форма препарата является одной из первых в мире сертифицированных наносистем, содержащих частицы диаметром не более 50 нм (патенты №96123311 от 12.1996, №2133122 от 10.1998). Препарат Фосфоглив обладает минимальной токсичностью, не вызывает аллергических реакций, устойчив при хранении. За счёт оптимально подобранного соотношения компонентов препарат обладает высокой биологической активностью, биодоступностью и эффективно восстанавливает функции печени. Подобная фосфолипидная наносистема может быть использована в дальнейшем в качестве транспортной системы для других лекарственных препаратов и генных конструкций.

В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоёв различают мультиламеллярные (многослойные) и моноламеллярные (однослойные) типы липосом.

Мультиламеллярные липосомы состоят из нескольких концентрических липидных бислоев. Их средний диаметр в зависимости от приготовления составляет 0,3–0,4 мкм или даже достигает нескольких микрон (до 10) в диаметре. Таким образом, мультислойные липосомы не могут быть отнесены к наночастицам. Однако, поскольку толщина липидного бислоя составляет менее 10 нм, можно определить такие частицы как микрочастицы, имеющие наноструктурированную поверхность. Мультиламеллярные липосомы осмотически активны: они изменяются в объёме при изменении осмотических свойств внешней среды.

Моноламеллярные липосомы состоят из одного бислоя. Различают малые моноламеллярные (диаметр 20–50 нм) и крупные моноламеллярные (диаметр 50–200 нм и выше) липосомы. Согласно определению ИЮПАК, наночастицами являются частицы с размерами 100 нм и менее, поэтому моноламеллярные липосомы можно отнести к наночастицам.

При парентеральном введении распределение липосом в организме зависит от состава липосомальной мембраны, их размера, заряда, других химических и физических параметров везикул и иммобилизованных в них веществ, а также от способа введения. Так, например, после подкожного введения основное количество липосом депонируется в месте введения и элиминируется оттуда преимущественно лимфогенным путём. Таким образом, местное введение липосомальных препаратов является оптимальным способом их доставки в регионарные лимфоузлы. При внутримышечном введении липосомы способны создавать депо препарата в месте введения, скорость элиминации из депо зависит от размера и свойств липосом и составляет от нескольких часов (если липосомы мелкие) до нескольких дней (если они крупные). Мелкие бислойные липосомы, в отличие от крупных, при внутрибрюшинном или внутримышечном введении гораздо быстрее проникают в кровеносное русло, что указывает на ограниченную способность последних проходить через капилляры и мембраны сосудов. При внутривенном введении мелкие липосомы выводятся из кровотока медленнее, чем крупные.

Особый интерес вызывает возможность перорального применения липосом. Хотя механизм всасывания липосомальных препаратов в желудочно-кишечном тракте до

конца не ясен, сообщений об их эффективности при пероральном приёме в литературе достаточно много. Так, например, несмотря на неоднозначные результаты по пероральному применению липосомального инсулина при лечении сахарного диабета, исследования в этом направлении продолжаются, а некоторые фирмы предполагают наладить промышленный выпуск этого препарата.

Липосомальные препараты, по сравнению с традиционными лекарственными формами для наружного применения, такими как мази и гели, обладают большей способностью проникать в кожу и волосы, а потому они более доступны для живых клеток-мишеней. Установлено, что липосомы интенсифицируют процессы взаимодействия активных веществ с кожей при лечебной наружной терапии, что приводит к повышению терапевтической эффективности иммобилизованных в них лекарственных веществ. Вероятнее всего, такой эффект вызван слиянием липосом с липидными ламеллами, не доходя до базального слоя, и высвобождением их внутреннего содержимого. Подвижные липиды липосом встраиваются в липидные ламеллы, увеличивая таким образом «жидкостность» барьера, что улучшает проницаемость. Другим важным путём проникновения липосом и их содержимого в глубь кожи являются волосяные фолликулы. Эффективность трансдермального липосомального переноса лекарственных веществ можно усиливать, используя методы ионо- и фонофореза.

В зависимости от состава бислоя липосом меняются их свойства. Наличие холестерина в липидном бислое приводит к увеличению жёсткости мембран липосом, уменьшает текучесть липидного бислоя и ограничивает проницаемость липидных мембран для малых водорастворимых молекул, а также увеличивает упругость и механическую прочность бислоя. Таким образом, присутствие холестерина способствует увеличению стабильности липосомы.

Лецитин (синоним — фосфатидилхолин) — один из четырёх основных мембранообразующих фосфолипидов в мембранах живых клеток, что делает его одним из наиболее удобных веществ для изготовления липосом. Для изменения заряда липосом можно использовать полиэтиленгликоль (ПЭГ), так как его наличие приводит к экранированию поверхностного заряда. Кроме того, молекулы ПЭГ создают в примембранной области избыточное осмотическое давление, что позволяет загружать в липосомы больше вещества, предотвращая осмотический разрыв. Одной из основной причин использования полиэтиленгликоля является его способность предохранять липосомы от поглощения их макрофагами, что приводит к увеличению времени циркуляции в кровеносном русле (иногда в 10 раз) и способствует накоплению в тканях-мишенях (например, различных опухолях). Липосомы как бы становятся невидимыми для РЭС (отсюда и название «stealth liposomes»).

Включение противоопухолевых препаратов в пространственно стабилизированные липосомы увеличивает их накопление в тканях с повышенной проницаемостью сосудов. Наличие прерывистого эндотелия и другие капиллярные аномалии, найденные в сосудистой сети опухоли во время неоангиогенеза, способствуют проникновению липосом во внутритканевое пространство солидных опухолей и их накоплению, где они действуют как система, непрерывно высвобождающая лекарственный препарат. Это явление получило название эффекта повышенной проницаемости сосудов (EPR-effect). Важным свойством защитных полимеров является их гибкость, которая позволяет относительно небольшому количеству присоединённых молекул создавать непроницаемый слой на липосомальной поверхности. Несмотря на то что ПЭГ попрежнему остаётся лидером среди защитных полимеров, продолжаются попытки найти другие соединения, которые могли бы быть использованы для получения пространственно стабилизированных липосом. Описано приготовление пространственно стабилизированных липосом с применением поли[К-(2-гидроксипропил)метакрила-

мида], поливинилпирролидонов, биорасщепляемых полимер-липидных конъюгатов и поливинилового спирта.

Роль липосом в противоопухолевой терапии не ограничивается доставкой лекарственных препаратов. Известно, что липосомы также могут быть использованы в нейтронзахватной терапии (boron neutron capture therapy) для селективной доставки терапевтических количеств атомов ^{10}B в опухолевые клетки.

Несмотря на достигнутые результаты в использовании ненаправленных липосомальных систем доставки лекарственных препаратов, были проведены исследования с целью повышения эффективности и селективности действия липосомальных противоопухолевых препаратов посредством лигандопосредованного транспорта липосом.

Во многих случаях, и для генной терапии не в последнюю очередь, важна адресная доставка в нужный тип клеток. В качестве «молекулярного адреса» можно выбрать иммуноглобулины (моноклональные антитела или их Fab-фрагменты), пептиды, имеющие комплементарные рецепторы на клетках-мишенях. Выбор лиганда зависит от антигена/рецептора, экспрессированного на поверхности клетки, куда необходимо доставить липосомы.

В настоящее время используются различные современные технологии для присоединения лиганда к дистальному концу активированного ПЭГ-липидного конъюгата, встроенного в липосомы. Липосомы, к поверхности которых присоединены моноклональные антитела или Fab-фрагменты моноклональных антител, назвали иммунолипосомами. Большинство принципов, применимых для иммунолипосом, также может быть использовано для липосом, модифицированных другими лигандами. Методика присоединения основана на трёх реакциях, которые являются достаточно эффективными и избирательными:

1) реакции между активированными карбоксильными группами и аминогруппами, в результате которой образуется амидная связь;

2) реакции между пиридилдитиолами и тиолами, в результате чего образуются дисульфидные связи;

3) реакции между малеимидными производными и тиолами, в результате которой формируются тиоэфирные связи.

Существуют и другие подходы, например образование карбаматной связи посредством реакции между n-нитрофенилкарбонильной и аминогруппой. Кроме того, для присоединения лигандов к липосомальной поверхности используется метод нековалентного связывания — через образование комплекса биотин–авидин/стрептавидин.

С помощью направленных липосом могут быть селективно доставлены не только противоопухолевые низкомолекулярные препараты, но и макромолекулы, включая белки, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды и ДНК.

В качестве направляющего вектора в последнее время всё большее внимание уделяется Fab-фрагментам как векторам, обладающим пониженной иммуногенностью и улучшенными фармако-кинетическими параметрами. Важным преимуществом использования этого класса лигандов является возможность выбора фрагмента антитела, обладающего наиболее высокой аффинностью к клетке-мишени. Анти-CD34-моноклональные антитела My 10, направленные против антигена CD34, экспрессированного на поверхности лимфоцитов при остром миелоидном лейкозе, были использованы для получения иммунолипосом с доксорубицином. Биотинилированные OX26-иммунолипосомы (OX26-моноклональные антитела, направленные против трансферринового рецептора крысы) специфически связываются с трансферриновым рецептором клеток поперечнополосатых мышц. Для достижения большего терапевтического эффекта при доставке лекарственного средства с помощью иммунолипосом необходима интернализация антигена после связывания с антителом, как

было показано, например, с клетками В-лимфомы и интернализующимися эпитопами (CD19).

Было показано полное ингибирование метастазов нейробластомы человека на модели бестимусных мышей при терапии Fab-иммунолипосомами, нагруженными доксорубицином. При необходимости в иммунолипосому можно добавлять контрастное средство, которое позволяет визуализировать распределение липосом и степень их накопления в зоне интереса. На рис. 17.1 (цветная вклейка) представлено схематическое изображение такой многофункциональной липосомы.

Рецепторопосредованный транспорт липосом. Создав специфический липосомный вектор, можно индуцировать рецепторопосредованный эндоцитоз и, как следствие этого процесса, транспорт различных веществ и соединений (заключённых во внутреннем объёме или встроенных в стенку липосом) непосредственно внутрь клетки.

Инсулинопосредованный транспорт липосом. Фрагменты Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn и Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn после их включения в липидный бислой способны устойчиво связывать липосомы с инсулиновым рецептором, что приводит к эндоцитозу липосом клетками феохромоцитомы крысы PC 12.

В условиях *in vivo* такие липосомы селективно поглощаются клетками печени, мышечными, жировыми и в значительной степени опухолевыми клетками.

Фолатопосредованный транспорт липосом. Рецепторы фолиевой кислоты (РФК) экспрессированы на опухолевых клетках при раке яичников, толстой кишки, молочной железы, лёгких, почечно-клеточной карциноме, метастазах эпителиальных опухолей в головной мозг и нейроэндокринной карциноме. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой и нагруженные доксорубицином, проявили более высокий цитотоксический эффект в экспериментах *in vitro* на $РФК^+$-клеточной линии по сравнению с ненаправленными липосомами, нагруженными тем же препаратом. Было установлено, что возможна направленная доставка макромолекул, а также липосом в живые клетки с помощью РФК-опосредованного эндоцитоза, позволившая преодолеть множественную лекарственную устойчивость. Липосомный даунорубицин, так же как и доксорубицин, был доставлен в различные опухолевые клетки посредством фолиевой кислоты, при этом было показано увеличение цитотоксического эффекта. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой, были предложены как транспортное средство для доставки антисмысловых олигонуклеотидов, а также генетического материала в опухолевые клетки.

Трансферринопосредованный транспорт липосом. Рецепторопосредованный эндоцитоз комплекса трансферринового рецептора и трансферринсвязанного железа — основной путь транспорта железа в клетку. Рецепторы трансферрина экспрессированы на поверхности множества опухолевых клеток.

Продемонстрирована возможность использования трансферринопосредованной доставки липосом к клеткам головного мозга. Иммунолипосомы, содержащие OX26-моноклональные антитела против трансферринового рецептора крысы, были использованы для доставки к эндотелиальным клеткам микрососудов мозга.

Интегринопосредованный транспорт липосом. На поверхности эндотелиальных клеток сосудов при ангиогенезе экспрессируются интегриновые рецепторы, которые обеспечивают адгезию эндотелиальных клеток к внеклеточному матриксу через последовательность Arg-Gly-Asp (RGD).

Несколько матриксных белков, содержащих RGD-последовательность, играют критическую роль в ангиогенезе и, следовательно, являются потенциальной мишенью для терапии, направленной на предотвращение образования новых сосудов.

Присоединение RGD-пептида к пэгилированным липосомам привело к увеличению связывания этих липосом с эндотелиальными клетками. Пэгилированные липосомы, нагруженные доксорубицином, можно селективно доставлять посредством RGD-пептида к интегриновым рецепторам эндотелиальных клеток сосудов опухоли.

С целью предотвращения агрегации тромбоцитов было предложено использовать RGD-липосомы для доставки антикоагулянтов или антитромбоцитарных фармацевтических средств к активированным тромбоцитам. Гипотеза подтверждена экспериментально, вследствие чего RGD-липосомы могут применяться для избирательной доставки в сердечно-сосудистую систему.

RGD-липосомы можно также с успехом использовать для избирательной доставки контрастно-диагностических соединений с флуоресцентными или парамагнитными свойствами (рис. 17.2, цветная вклейка). При этом можно видеть, что такие липосомы позволяют наблюдать эффект противоопухолевого воздействия различных препаратов — в данном случае ингибиторов ангиогнеза.

Транспорт липосом, опосредованный рецепторами факторов роста. Поиск новых лигандов для направленного транспорта липосом сфокусирован на изучении специфических рецепторов и белков-ферментов, синтезируемых в клетках-мишенях (особенно опухолевых клетках). Известно, что рецептор к эпидермальному фактору роста экспрессирован на клетках различных солидных опухолей: рака молочной железы, рака лёгких, глиомы, рака толстой кишки и др. Присоединение ATWLPPR-пептида, обладающего сродством к рецептору сосудистого фактора роста, к пэгилированным липосомам привело к увеличению их связывания с эндотелиальными клетками пупочной вены человека. Липосомы, к поверхности которых были присоединены антитела C225, направленные против рецепторов фактора роста, были селективно доставлены к различным опухолевым клеткам, на поверхности которых экспрессирован такой рецептор.

Липосомальный транспорт белков, пептидов, нуклеиновых кислот. Применение аспарагиназы, заключённой в липосомы, увеличило выживаемость животных с аспарагинзависимыми опухолями P1534 по сравнению со свободным ферментом. Важной особенностью этого метода является то, что инкапсулирование аспарагиназы в липосомы предотвращает выработку антител против аспарагиназы.

Экспериментальная тромболитическая терапия тромбоза яремной вены у кроликов индуктором плазминогена, заключённым в липосомы, показала более высокую степень лизиса по сравнению со свободным нативным ферментом. Для достижения аналогичных результатов потребовалось применить дозу нативного фермента в 4 раза выше, чем липосомального.

Для доставки ДНК были получены направленные катионные липосомы путём присоединения нейтральных липидов к моноклональным антителам MOC31. Эти антитела способны специфически узнавать гликопротеин EGP-2, экспрессированный на клетках карциномы. Аналогично были модифицированы моноклональные антитела Herceptin, способные специфически узнавать белок HER-2/neu, экспрессированный на поверхности опухолевых клеток молочной железы и яичников. Применение таких направленных липосом для доставки ДНК привело к увеличению количества трансфицированных клеток. Кроме того, катионные иммунолипоплексы, направленные против рецептора трансферрина, были использованы для p53-опухольподавляющей генной терапии.

В последнее время было предложено использование поликатионных липосом для доставки генетического материала, которые представляют собой липосомы, модифицированные ацетилированным полиэтиленимином, присоединённым к мембране через ацетильные остатки и связывающим ДНК с помощью положительных зарядов.

Такие липосомы демонстрируют высокую степень нагрузки ДНК (или другим генетическим материалом) и высокую эффективность трансфекции.

Как известно, липосомы накапливаются преимущественно в печени, что послужило поводом их использования для доставки инсулина. Липосомальный гормон проявил себя как препарат пролонгированного действия за счёт увеличения продолжительности циркуляции инсулина в кровотоке и его постепенного высвобождения из липосом, обеспечивая тем самым постоянство его концентрации в крови в течение длительного времени. Фармакодинамика инсулина в пэгилированных липосомах при внутривенном введении была изучена в экспериментах *in vivo*. Попытка увеличить биодоступность перорального липосомального инсулина в экспериментах на животных путём покрытия поверхности липосом полиэтиленгликолем принесла положительные результаты. Эффективность такого метода доставки была подтверждена на крысах. Интерес к липосомальному инсулину для перорального применения всё возрастает. Для увеличения биодоступности такого инсулина исследователи ищут пути провышения мукоадгезивных свойств липосомы. Для этого оказалось удобным использовать хитозан. Обнаружено существование линейной зависимости адгезивной способности липосом от количества хитозана. Эффект мукоадгезивности объясняют электростатическим взаимодействием и физическими свойствами хитозана, сорбирующегося на поверхности липосом, с компонентами слизистой кишечника. Покрытие из хитозана пролонгированно высвобождает инсулин из липосом, вследствие наличия зависимости от величины pH диспергирующей среды, так как диффузия инсулина из липидных везикул зависит от величины pH. Важно, что пероральный липосомальный инсулин оказывает гиполипидемический эффект, поэтому создание такого лекарственного препарата вполне возможно.

Другим примером использования липосомальных пептидов стало применение липосомального циклоспорина при трансплантации солидных органов — предупреждение отторжения трансплантата после аллогенной трансплантации комбинированного препарата сердце–лёгкое. Эффективность применения липосомального циклоспорина в виде аэрозоля показана в экспериментах на собаках. Включение рекомбинантного интерлейкина-2 в липосомы способствовало снижению его токсичности и повышению биологической активности благодаря увеличению продолжительности его циркуляции в крови. Пэгилированные липосомы также были предложены для перорального применения рекомбинантного эпидермального фактора роста человека.

Несмотря на то что липосомы широко используются для доставки биологических объектов, до сих пор липосомальная доставка макромолекул, не способных самостоятельно проходить через мембраны, была малоэффективна. Одним из способов повышения эффективности переноса макромолекул в цитоплазму является использование воссозданной оболочки человеческого вируса гриппа А. Виросомы представляют собой передовые, широко применяемые транспортные системы с перспективой использования для терапии опухолей и предотвращения метастазирования, нейродегенеративных изменений и инфекционных заболеваний. Различные биологически активные молекулы, такие как антибиотики, цитостатики, нуклеиновые кислоты, фунгициды и антигены, могут быть инкапсулированы в виросому. Поверхность виросомы так же, как и поверхность липосомы, может быть модифицирована различными низко- и высокомолекулярными соединениями.

Виросомы — это сферические монослойные везикулы со средним диаметром 150 нм. Они представляют собой пустую оболочку вируса гриппа, лишённую нуклеокапсида, включая генетический материал самого вируса. В отличие от липосом виросомы содержат функциональные гликопротеины вирусной оболочки — гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа, встроенные в фосфолипидный бислой. Характеристики виросом зависят от выбора компонентов бислоя. Они могут быть

оптимизированы для максимального включения препарата или достижения наилучшего физиологического эффекта путём изменения процентного содержания или типа липидов в мембране. В случае положительного заряда фосфолипидов виросомы также используются для доставки генетического материала. С целью обеспечения избирательной доставки поверхность виросом может быть модифицирована различными лигандами, такими как цитокины, пептиды, моноклональные антитела.

Уникальные свойства виросом частично связаны с присутствием в их мембране гемагглютинина вируса гриппа. Он способствует связыванию с клеткой-мишенью и рецепторопосредованному эндоцитозу. Заключённый в эндосому виросомальный гемагглютинин, активированный кислым значением pH среды, способствует слиянию мембран и высвобождению биологически активных соединений в цитоплазму клетки-мишени. Это делает виросомы перспективными транспортными системами для доставки биологически активных молекул. Виросомы можно использовать для доставки белковых антигенов и применять в противоопухолевой терапии.

Интересным новым направлением является возможность создания липидных везикул, имеющих тропность не только к отдельным клеткам, но и к органеллам. Иллюстрацией такой возможности могут служить липосомы с трифенилфосфониевыми катионами, имеющими тропность к митохондриям (рис. 17.3, цветная вклейка).

Таким образом, липосомальные системы доставки лекарственных веществ постоянно развиваются. Такие свойства липосом, как биосовместимость, защита включённых веществ от захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы и метаболической деградации, возможность доставки гидрофобных и гидрофильных соединений к различным органам и тканям организма и, более того, способность доставлять эти соединения в цитоплазму клетки-мишени, делают их привлекательными для использования как в медицине, так и в научных исследованиях.

Постепенно складывается модель «идеальной» липосомы как средства направленной доставки лекарственного вещества в клетку. Такая липосома содержит во внутреннем объёме лекарственное вещество, например ДНК в случае генной терапии, на её поверхности иммобилизованы гибкие цепи полимера для уменьшения поглощения клетками ретикуло-эндотелиальной системы, молекулярный адрес, в мембрану инкорпорированы белки слияния. Кроме того, мембрана состоит не только из обычных фосфолипидов, образующих бислой (чаще фосфатидилхолина), но и липидов, способствующих слиянию с мембраной клетки.

Однако всё ещё остаются и некоторые проблемы для совершенствования липосомальных лекарственных средств. Основной недостаток липосом как лекарственной формы — относительно небольшая стабильность при хранении. Этого недостатка лишены полимерные наночастицы, имеющие практически те же области возможного применения. Но в отличие от липосом полимерные наночастицы состоят из менее безопасного материала, чем фосфолипиды. Липосомы сравнительно легко разрушаются в организме, высвобождая доставленные вещества, при этом до взаимодействия с клетками, липосомы защищают своё содержимое от контакта с иммунной системой, который может вызвать последующее разрушение данного вещества и/или стать причиной развития аллергических реакций

17.2. Наночастицы на основе углерода — фуллерены

Углерод является основой органической жизни на Земле, входит в химической состав земной флоры и фауны. В составе углекислого газа его в огромных количествах выделяют живые организмы и поглощают растения и деревья, углекислый газ выбрасывается в атмосферу в процессе сжигания органического топлива.

Среди других химических элементов углерод выделяется многочисленностью и разнообразием своих химических соединений. Число его только изученных соединений примерно в 50 раз превышает количество химических соединений всех остальных химических элементов, вместе взятых. Отметим, что в основе искусственных органических полимеров, получивших в последнее время самое широкое применение в различных отраслях промышленности, лежит гигантская цепочка из атомов углерода.

С другой стороны, углерод в аллотропной модификации графита инертен к большинству химически активных сред, что позволило предположить его биологическую совместимость с тканями живого организма.

Эксперименты подтвердили биологическую инертность графита. Создание промышленного производства углеграфитовых материалов конструкционного назначения обеспечило возможность приступить к практической реализации проекта по медицинскому применению углерода. Однако углеродные материалы традиционной технологии обладают высокой пористостью, которая может достигать 30 %, что резко ограничивает потенциальные возможности их применения в качестве силовых элементов конструкций искусственных органов живого организма. Попытки устранения пористости путём пропитки углеродного материала термореактивными полимерами или насыщения сплавами металлов не решают проблему, поскольку привносят в состав материала биологически активные компоненты, что, в конечном итоге, означает необходимость повторной операции.

Создать углеродный материал, удовлетворяющий практически всем требованиям эксплуатации имплантантов и эндопротезов, удалось на принципах нанотехнологии, открывшей новую аллотропную форму углерода.

До недавнего времени было известно, что углерод образует три аллотропных формы: алмаз, графит и карбин. Аллотропия, от греч. allos — иной, tropos — поворот, свойство, — это существование одного и того же элемента в виде различных по свойствам и строению структур. Начиная с 1990 г., когда два учёных, Вольфганг Кретчмер и Дональд Хаффман (Wolfgang Kraetchmer и Donald Huffman) со своими аспирантами опубликовали в журнале Nature статью, в которой описали метод получения фуллеренов испарением графитовых электродов в электрической дуге в атмосфере гелия, стало известно о четвёртой аллотропной форме углерода, названной фуллереном. С открытием фуллеренов, углеродных нанотрубок и их производных число известных структур углерода продолжает интенсивно увеличиваться.

В литературе можно встретить термин «наноуглерод» (nanocarbon) для обозначения семейства, состоящего из различных типов фуллеренов, углеродных нанотрубок, нанографита, наноалмазов [3]. В настоящее время уделяется большое внимание применению фуллеренов (C_{60} и C_{70}) в современных технологиях и, особенно, в медицине, что обусловлено их специфическим строением и широким кругом биологической активности, а также терапевтическими эффектами. Фуллерены по форме похожи на покрышку традиционного футбольного мяча и мяча для американского футбола, т. е. их форма близка к сферической. Только диаметр этих мячей около 0,7 нм.

Нанотрубки — по форме цилиндры, причём длина может в тысячи раз превышать диаметр, который также около 0,7 нм. Поэтому «крышечками» таких цилиндров могут быть «половинки» фуллеренов. Толщина сферической оболочки 0,1 нм, радиус молекулы C_{60} составляет 0,357 нм. Длина связи C–C в пятиугольнике равна 0,143 нм, в шестиугольнике — 0,139 нм.

Молекулы высших фуллеренов, C_{70} C_{74}, C_{76}, C_{84}, C_{164}, C_{192}, C_{216}, также имеют форму замкнутой поверхности. Фуллерены с $n < 60$ оказались неустойчивыми.

Химические модификации фуллеренов и их биологическая активность. Молекулы фуллеренов, в которых атомы углерода связаны между собой как одинарными, так и двойными связями являются трёхмерными аналогами ароматических структур. Обладая высокой электроотрицательностью, они выступают в химических реакциях как сильные окислители. Присоединяя к себе радикалы различной химической природы, фуллерены способны образовывать широкий класс химических соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами.

Присоединение к C_{60} радикалов, содержащих металлы платиновой группы, позволяет получить ферромагнитные материалы на основе фуллерена. В настоящее время известно, что более трети элементов периодической таблицы могут быть помещены внутрь молекулы C_{60}. Имеются сообщения о внедрении атомов лантана, никеля, натрия, калия, рубидия, цезия, атомов редкоземельных элементов, таких как тербий, гадолиний и диспрозий.

Разнообразие физико-химических и структурных свойств соединений на основе фуллеренов позволяет говорить о химии фуллеренов как о новом перспективном направлении органической химии.

Фармакологические свойства фуллеренов и их производных. Сами по себе углеродные фуллерены как сильные окислители обладают цитотоксичностью, связанной с индукцией перекисного окисления липидов. Поэтому для создания фуллеренов с удовлетворительной биосовместимостью необходимы их химические модификации (например, включение гидроксильных или N-этиламино-групп). Маленький размер фуллеренов и возможность присоединения к ним лекарственных средств и других дигидроксиапатитов, придающих им органотропность, позволяет на их основе разрабатывать новый тип лекарственных средств. Выявлено, что фуллереновое ядро обладает чрезвычайно высокой способностью улавливать свободные радикалы, что делает фуллерены перспективными для возможного применения при патологиях, связанных с повреждающим действием радикалов (при болезни Паркинсона, Альцгеймера или ишемии тканей). Показано, что фуллерены способны уменьшать апоптоз нейронов, индуцируемый радикалами кислорода. Ингибируя уровень радикалов кислорода, фуллерены могут оказывать противоаллергический эффект, обнаруженный Ryan и др. [4].

Исследователи экспериментировали с тучными клетками человека и мышей. Эти клетки в больших количествах содержатся в лимфатических узлах, селезёнке и костном мозге. При контакте с аллергенами они начинают активно вырабатывать гистамин — биологически активное вещество, участвующее в запуске аллергической реакции.

Как показали эксперименты, добавление модифицированного фуллерена-C_{60} сокращало продукцию гистамина в колонии клеток приблизительно в 50 раз. Аллергическая чувствительность также значительно сокращалась у подопытных мышей, получавших инъекции этого соединения. При этом, вопреки опасениям исследователей, не было выявлено каких-либо признаков токсичности использовавшегося в эксперименте наноматериала. Молекулы фуллерена-C_{60} обладают высоким сродством к электронам, а значит должны активно связывать свободные радикалы, высокие уровни которых провоцируют развитие аллергического ответа. Таким образом, использование гидроксильных производных фуллеренов открывает новые возможности в борьбе с аллергией, а также, возможно, и с целым рядом воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Весьма перспективным является идея создания противораковых препаратов на основе водорастворимых эндоэдральных соединений фуллеренов (это молекулы фуллеренов, внутри которых помещён один или более атомов какого-либо элемента)

с радиоактивными изотопами или соединениями для нейтронозахватной терапии (гадолиний, бор, висмут). Найдены условия синтеза противовирусных и противораковых препаратов на основе фуллеренов. Одна из трудностей при решении этих проблем — создание водорастворимых нетоксичных соединений фуллеренов, которые могли бы вводиться в организм человека и доставляться кровью в орган, подлежащий терапевтическому воздействию. Американская компания C-Sixty Inc. проводит предклинические испытания средств на основе фуллереновых наносфер C_{60} с упорядоченно расположенными на их поверхности химическими группами. Эти группы могут быть подобраны таким образом, чтобы связываться с заранее выбранными биологическими мишенями. Спектр возможных применений чрезвычайно широк. Он включает борьбу с вирусными заболеваниями, такими как грипп и ВИЧ, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, остеопорозом, заболеваниями сосудов. Например, наносфера может содержать внутри атом радиоактивного элемента, а на поверхности — группы, позволяющие ей прикрепиться к раковой клетке.

В Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) использовали аддукт фуллерена с поливинилпирролидоном (ПВП). Это соединение хорошо растворимо в воде, а полости в его структуре близки по размерам молекулам C_{60}. Полости легко заполняются молекулами фуллерена, и в результате образуется водорастворимый аддукт с высокой антивирусной активностью. Поскольку сам ПВП не обладает антивирусным действием, вся активность приписывается содержащимся в аддукте молекулам C_{60}. В пересчёте на фуллерен его эффективная доза составляет примерно 5 мкг/мл, что значительно ниже соответствующего показателя для ремантадина (25 мкг/мл), традиционно используемого в борьбе с вирусом гриппа. В отличие от ремантадина, который наиболее эффективен в ранний период заражения, аддукт C_{60}/ПВП обладает устойчивым действием в течение всего цикла размножения вируса. Другая отличительная особенность сконструированного препарата — его эффективность против вируса гриппа А и В.

Так как фуллерены могут эффективно реагировать с радикалами, то модификация поверхности радикалами оказывается чрезвычайно эффективной. Однако вследствие малой растворимости негидроксилированных фуллеренов реакция с перекисью в водной среде не протекает. Поэтому модификации подвергли фуллерен с 12 гидроксильными группами, который может быть синтезирован известными методами. Суспензия фуллеренола в 30%-м водном растворе перекиси водорода выдерживалась при 60 °С при интенсивном перемешивании. Через 2–4 дня красно-бурая взвесь становилась прозрачной и приобретала жёлтый цвет. После этого были произведены спектрометрические измерения, позволившие установить количество гидроксильных групп в зависимости от условий проведения реакции (количества прекурсоров, режима нагрева, режима перемешивания и времени проведения). К полученным растворам добавляли смесь из пропанола-2, диэтилового эфира и гексана, что позволяло выделить молочно-белые растворы искомых фуллеренолов. После отделения центрифугированием и декантацией, двукратного промывания диэтиловым эфиром и 18-часовой сушки были получены сухие порошки от жёлто-бурого до белого оттенков. Выход составил, в зависимости от получаемого продукта, около 60–70%. Подробно исследованы методами масс-спектрометрического анализа, термогравиметрического анализа, ИК- и УФ-спектроскопии $C_{60}(OH)_{36}\cdot 8H_2O$ и $C_{60}(OH)_{40}\cdot 9H_2O$. На поверхности присутствовали различного рода кислородсодержащие группы — карбонильные, карбоксильные, пероксидные, однако определяющими являются именно гидроксильные группы. Отдельно следует упомянуть дисперсность получающихся растворов. Согласно данным анализа динамического светорассеяния, растворы фуллеренов дисперсны на молекулярном уровне, однако при увеличении pH происходит агломерация.

Это объясняет необходимость получения растворов, не содержащих ионов Na^+, вызывающих слипание за счёт усиления межмолекулярного взаимодействия.

Водорастворимые фуллерены являются многообещающими материалами для использования в медицине и косметологии из-за ожидаемой эффективности захвата ими свободных радикалов различного происхождения. Это обусловливает особый интерес к доступным и простым методам синтеза водорастворимых фуллеренов в промышленном масштабе. Полигидроксилированный фуллерен, называемый фуллеренолом, обладающий простой структурой, удобной для практического применения, малой токсичностью, нейтральным pH раствора и возможностью дальнейшей модификации, в дополнение к выраженной способности к захвату радикалов, рассматривается как наиболее перспективный представитель водорастворимых фуллеренов.

Известно несколько способов синтеза полигидроксилированных фуллеренов с различным числом OH-групп. Так, фуллеренолы с 12 или меньшим числом OH-групп довольно ограниченно растворимы, в то время как производные с 16 или 20–24 гидроксильными группами демонстрируют необходимую растворимость (рис. 17.4.).

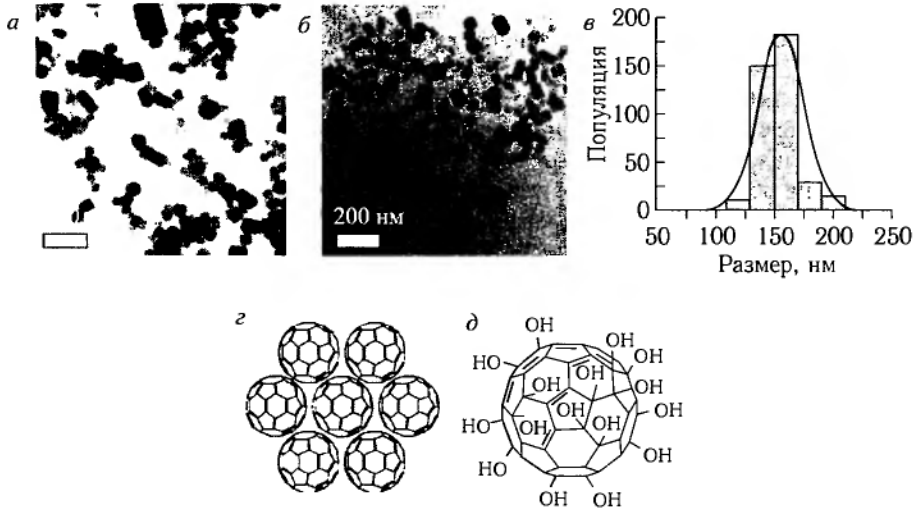


Рис. 17.4. Водорастворимые гидроксилированные наночастицы углерода: *а* и *б* — изображение наночастиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии; *в* — гистрограмма суспензии наночастиц; *г* и *д* — химическая структура наночастиц в водной суспензии

В табл. 17.1 представлены свойства наночастиц углерода.

Таблица 17.1

Свойства нативных и гидроксилированных (фуллеренолов) наночастиц углерода

Свойство	Нано-C_{60}	$C_{60}(OH)_{24}$
Размер	160 ± 50 нм	—
Поверхностный заряд	−30 мВ	0
Кристаллизация	Простые гексагональные кристаллы	Не образуют кристаллов

Большинство изученных фуллеренолов были получены взаимодействием с NaOH как источником гидроксильных групп, что делает необходимым удаление ионов натрия, неизбежно присутствующих в растворе. Без применения многократной процедуры хроматографической очистки отделение ионов натрия является трудоёмкой задачей. Описан новый доступный метод синтеза фуллеренолов с 36–40 гидроксильными группами, имеющих растворимость в воде вплоть до 58,9 мг/мл, где используется перекись водорода как донор OH-групп.

Крайне интересно и другое направление нанобиотехнологии — изучение действия углеродных наноконструкций — фуллеренов на живые системы. Например, фуллерены оказались эффективным инструментом для разрушения амилоидных образований. Амилоидозы (амилоидные болезни) — большая группа заболеваний, характеризующаяся отложениями белка в виде нерастворимых фибрилл (амилоидов) в разных органах и тканях, включая мышцы. Их накопление разрушает структуру тканей и органов, приводя к болезни и летальному исходу. Болезнь наступает в результате разворачивания нормального белка и его неправильного сворачивания в фибриллы. В настоящее время известно более 30 разных белков-предшественников амилоидов, вовлечённых в амилоидные болезни.

Показано, что амилоиды играют центральную роль в патогенезе заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, диабет II типа и другие, от которых страдают миллионы пациентов. Амилоидные структуры найдены также в мышцах при кардиомиопатиях, миокардитах и миозитах. Особую актуальность изучение амилоидов приобрело в связи с распространением смертельных прионовых болезней (прионовых амилоидозов) человека и животных.

Развитие на основе фуллеренов терапевтических методов лечения и предупреждения этих заболеваний, а также разработка их прижизненной диагностики, которая сейчас чаще всего посмертная, является актуальной задачей исследований в этой области. В наибольшей мере это относится к мышечным амилоидозам как наименее изученным. Учитывая возможность разработки прижизненной диагностики в случае мышечных амилоидозов, их исследование открывает перспективы для выяснения разных стадий амилоидогенеза и для разработки подходов к управлению этим процессом, в том числе с использованием таких наноструктур, как фуллерены.

Ещё одно направление использования фуллереновых наноструктур — это декальцинирование аллотрансплантатов клапанов сердца. Особенно это важно для детей раннего возраста, у которых кальциноз пересаженных клапанов приводит к смерти.

Углеродные нанотрубки изучаются с точки зрения их возможного использования для технологий направленной доставки лекарственных веществ. Однослойные углеродные нанотрубки могут доставлять фрагменты ДНК и РНК в человеческие Т-клетки. Ранее для доставки лекарственных веществ и фрагментов ДНК использовали нанокапсулы и липосомы. Но в случае с вирусом иммунодефицита человека нанокапсулы не могут проникнуть внутрь Т-клеток для доставки РНК-отрезка, блокирующего синтез рецепторов CD4, благодаря которым вирус поражает Т-клетки. Хонджи Дай (Hongjie Dai) и его коллеги в своём исследовании показали, что нанотрубки, содержащие нужную РНК-последовательность, могут попадать внутрь Т-клеток, играющих основную роль в работе иммунитета человека. Как только клетка прекращает синтезировать рецепторы CD4, вирус не может уже её атаковать. В этой связи учёные заинтересовались изучением нанотрубок как способом внутриклеточной доставки РНК-цепочек, блокирующих синтез рецепторов.

Для превращения нанотрубки в «носитель» Хонджи и его коллеги присоединили к поверхности наноструктуры фосфолипиды, благодаря которым нанотрубка могла

проникнуть внутрь клетки. К концам фосфолипидов были добавлены РНК-отрезки. При попадании нанотрубок с грузом в Т-клетку сульфидный мостик, удерживающий РНК, рвётся и молекула «защищает» клетку от вируса.

17.3. Дендримеры

Дедримеры — это древообразные полимеры (греч. dendron — дерево), молекулы которых имеют большое число разветвлений.

Дендримеры имеют размер от 1 до 10 нм. Синтез дендримеров — это одна из нанотехнологий, тесно соприкасающихся с химией полимеров. Как и все полимеры, дендримеры состоят из мономеров, но молекулы этих мономеров имеют ветвистую структуру. Дендример становится похожим на дерево с шарообразной кроной, если в процессе роста полимерной молекулы не происходит соединения растущих ветвей (подобно тому, как ветви одного дерева или кроны рядом стоящих деревьев не срастаются). На рис. 17.5 (цветная вклейка) показано, как могут образовываться такие дендримеры, похожие на шарообразные структуры.

Внутри дендримера могут образовываться полости, заполненные веществом, в присутствии которого дендримеры были образованы. Если дендример синтезирован в растворе, содержащем какой-либо лекарственный препарат, то этот дендример становится нанокапсулой с данным лекарственным препаратом. Кроме того, полости внутри дендримера могут содержать вещества с радиоактивной меткой, применяемые для диагностики различных заболеваний.

Конечно, многообещающим направлением в применении дендримеров является их возможное использование в качестве нанокапсул, доставляющих лекарства непосредственно клеткам, нуждающимся в этих препаратах. Центральная часть таких дендримеров, содержащая лекарственное вещество, должна быть окружена оболочкой, предотвращающей утечку вещества, к внешней поверхности которой необходимо прикрепить молекулы (антитела), способные прилипать именно к поверхности клеток-адресатов. Как только такие нанокапсулы-дендримеры достигнут больных клеток и прилипнут к ним, необходимо уничтожить внешнюю оболочку дендримера, например с помощью лазера, или сделать эту оболочку саморазлагающейся.

При получении дендримеров с каждым элементарным актом роста молекулы количество разветвлений увеличивается. В результате, с увеличением молекулярной массы изменяются форма и жёсткость молекул, что, как правило, сопровождается изменением физико-химических свойств, таких как характеристическая вязкость, растворимость, плотность и др.

На сегодняшний день учёные научились удерживать на поверхности дендримеров с помощью хелатных групп ионы металлов. Например, такие дендримерные «метки» на основе гадолиния и марганца можно использовать в качестве контрастирующих агентов при проведении исследований с помощью метода магнитного резонанса. Они, например, позволяют легко проследить «судьбу» введённых в организм подопытного животного стволовых клеток. Это особенно важно в случае клеток, подсаженных в мозг.

Возможность прикрепления к дендримерам сразу нескольких различных молекул нашла своё применение при лечении злокачественных опухолей. Фолиевая кислота нужна всем клеткам для роста. Однако на мембранах раковых клеток располагается в тысячу раз больше рецепторов, присоединяющих фолиевую кислоту, чем у нормальных клеток. Таким образом, если фолиевая кислота прикрепляется к «веткам» дендримеров, раковые клетки всасывают дендримеры целиком — вместе с лекарственным веществом, которое их убивает. Прикрепление одновременно к «ветвям» полимера сильного противоопухолевого аппарата, флюоресцентного красителя и фолиевой кис-

лоты позволяет точно доставлять препарат в раковую опухоль и минимизировать побочные эффекты от токсичного противоопухолевого лекарства.

Юнсэон Чой (Youngseon Choi) и его коллеги из университета Мичигана использовали молекулы ДНК для построения наночастиц с заданными свойствами. Исследователи работали с так называемыми дендримерами — крошечными разветвлёнными полимерами, концы которых могут содержать различные группы атомов.

Специально «спроектированные» полимеры могут использоваться для обнаружения больных тканей, точной доставки лекарств к нужным клеткам и в других подобных целях. Однако синтез нужных цепочек занимает в иных случаях по нескольку месяцев.

Чой сначала синтезировал несколько отдельных звеньев дендримеров, каждое из которых снабдил «целевой» молекулой (которая служила лекарством), а также маленьким фрагментом «половинки» ДНК. При смешивании всех этих ингредиентов ДНК соединялись в соответствии с дополнительными парами оснований и автоматически сшивали короткие звенья полимера в длинные комплексы. Такие терапевтические дендримеры могли бы избирательно поставлять пять отдельных лекарств пяти видам клеток. При этом синтез такой супермолекулы по методике Чоя занимает 10 шагов, вместо 25 при использовании прежних технологий.

Возможности использования дендримеров для генной терапии представлены на рис. 17.6 (цветная вклейка).

17.4. Наночастицы металлов

Наночастицы металлов в настоящее время также имеют весьма обширные перспективы использования в качестве лекарственных средств для диагностики и для лечения ряда заболеваний.

Ставится вопрос о необходимости разработки основ применения магнитных наночастиц в системах целенаправленного переноса биологически активных веществ и лекарственных соединений, в частности лечения онкологических опухолей с использованием резонансной магнитной термотерапии. Наиболее важные свойства наночастиц металлов, которые требуется определять в процессе их получения, представлены в табл. 17.2.

Таблица 17.2

Некоторые свойства наночастиц металлов

Магнитные	Электрические	Структурные	Химические
Магнитный домен	Проводимость	Образование новых фаз	Растворимость
Суперпарамагнитные системы	Электронные подсистемы	Поверхностные слои	

При работе с наночастицами металлов необходимым этапом является их аттестация, которая может быть осуществлена с помощью различных методов (рис. 17.7).

Аттестация наночастиц (НЧ) металлов направлена на установление особенностей их строения, что в свою очередь определяет их функциональное назначение.

Для получения биологически активных свойств препарата необходимо:

— получить стабильный раствор НЧ в жидкой среде — воде, физиологическом растворе или другом носителе;

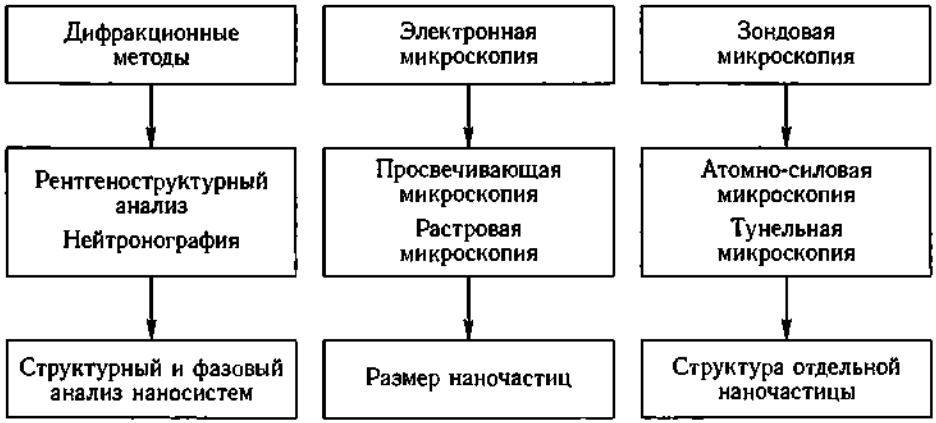


Рис. 17.7. Методы аттестации

— провести ультразвуковую обработку препарата;
— использовать сильноокисленные НЧ металлов.

В этой связи восстановление проводят не полностью и прерывают на стадии восстановления железа на 85 %.

Сырьё готовят взаимодействием трёххлорного шестиводного железа с аммиаком водным. После получения гидроксида необходимо провести шестикратную промывку для очищения его от хлорсодержащих примесей.

Мёссбауэровский спектр НЧ гидроксида железа имеет вид дублета, что характерно для $Fe(OH)_3$. Результаты мёссбауэровской спектросокпии показывают однофазность полученного гидроксида и отсутствие в нём значительных примесей. Удельная поверхность НЧ $Fe(OH)_3$ составляет 87,6 $м^2/г$.

Из изображения, полученного методом ПЭМ (просвечивающая электронная микроскопия), электронограммы и рентгенограммы НЧ гидроксида железа видно, что НЧ имели диаметр от 10–100 нм. Они представляют собой плоские сферические образования и находятся в аморфном состоянии. При облучении узким электронным пучком НЧ гидроксидов железа в высоковольтном ПЭМ при $U = 250$ кВ в результате нагрева происходит удаление адсорбированной и структурной воды, по этой причине при наблюдении *in sito* в ПЭМ на изображениях НЧ $Fe(OH)_3$ формирует пятнистый контраст.

Рентгеноструктурный анализ выявляет в наночастицах железа наличие фаз Fe, FeO, Fe_3O_4, Fe_2O_3.

Проведение рентгеновского фотоэлектронного спектроскопического (РФЭС) анализа показало, что на поверхности НЧ железа присутствует фаза Fe_2O_3. По данным РФЭС-анализа, химический сдвиг составил 5 эВ, что говорит о сильной окисленности НЧ железа. Это является одним из непременных условий биологического действия препаратов, приготовленных на основе НЧ металлов. Изображение наночастиц оксида железа, получаемое с помощью атомной силовой микроскопии, представлено на рис. 17.8 (цветная вклейка).

Из ПЭМ-изображения видно, что размер НЧ железа находится в пределах 100 нм, и они либо обладают огранкой, либо нет. Величина удельной поверхности наночастиц железа, используемого в качестве биологически активного препарата, составляла $S_{уд} = 32{,}0$ $м^2/г$ и средний размер по ПЭМ-изображениям $D_{нм} = 82 \pm 57$ нм. Высокоразрешающая электронная микроскопия (ВРЭМ), позволила установить, что оксидные фазы присутствуют как в виде поверхностных оксидных плёнок, так

и множества НЧ, в основном фазы Fe_3O_4, о чём свидетельствует их темнопольное изображение в рефлексе Fe_3O_4.

На основе НЧ железа был приготовлен биологически активный препарат, исследованный на проявление ранозаживляющих свойств и ускорение регенерации повреждённой кожи. В качестве основы носителей были выбраны полиэтиленгликоли (ПЭГ) и метилцеллюлоза (МЦ). НЧ магния были получены левитационноструйным методом. Метод является разновидностью конденсационного метода. Фазовый рентгеновский анализ показал, что НЧ состоят из фаз металлического магния и гидроксида магния $Mg(OH)_2$. Пики сильно уширены, в особенности у гидроксида магния. На линии (101) фазы Mg наблюдаются наплывы, вызванные, скорее всего, неравноосностью частиц. По данным рентгеноструктурного анализа были определены периоды решётки a и c в фазе Mg. Так, $a = 0{,}32067$ нм, что меньше, чем для крупнокристаллического состояния ($a = 0{,}32084$ нм). Период решётки $c = 0{,}52167$ нм оказался больше, чем для крупнокристаллического состояния ($c = 0{,}52103$ нм).

Известно, что НЧ металлов после их получения имеют на своей поверхности пассивирующие оксидные плёнки. Можно полагать, что в результате хранения на воздухе на поверхности НЧ магния формируются плёнки, состоящие из гидроксидов магния. Под воздействием электронного пучка в ПЭМ происходит удаление воды из гидроксида. В результате при наблюдении *in sito* в ПЭМ создаётся впечатление, что поверхность частички как бы «пузырится» и таким образом приобретает пятнистый контраст. На основе НЧ магния были приготовлены ранозаживляющие препараты. В качестве основы-носителя были выбраны также МЦ и ПЭГ.

Для исследования ранозаживляющих свойств НЧ металлов использовали взрослых мышей-самок линии SHK, массой 18–20 г. Мышей делили на группы по 5–7 животных в каждой. Под эфирным наркозом на спине у мышей выстригали шерсть, по трафарету наносили контуры раны (круг площадью 60 мм^2) и затем с помощью хирургических ножниц с закруглёнными концами вырезали лоскут кожи. Мышам опытной группы сразу же после операции (в дальнейшем ежедневно) на поверхность ран наносили 0,2 г исследуемой композиции. Мышам контрольной группы наносили 0,2 г основы композиции без НЧ металла. В группе нелеченых животных поверхность раны ничем не обрабатывали. По кинетическим кривым изменения площади ран в процессе регенерации рассчитывали период полузаживления ран.

В целом полученные данные по ранозаживляющей активности НЧ железа и магния в составе созданных лекарственных форм (ЛФ) позволили сделать следующие заключения.

1. Установлено, что НЧ железа и магния стимулируют процессы регенерации экспериментальных полнослойных ран, сокращая период полузаживления ран на 30–60% по сравнению с нелеченными животными и на 30–80% по сравнению с животными, леченными основами-носителями НЧ. Степень появления ранозаживляющего действия НЧ зависит от вида элемента (магний или железо) и вида основы-носителя.

2. Биологически активные препараты на основе НЧ железа и магния имеют кроме металлической фазы, оксидную и гидроксидную. Последние, присутствующие на поверхности НЧ металлов, образуют защитную «шубу», которая предохраняет от быстрого её растворения, обеспечивая регенерирующую активность, ускоряя заживление экспериментальных полнослойных ран, при этом обладая пролонгированным действием.

Одним из эффективных подходов является применение магнитных частиц (МЧ) с последующей детекцией параметров их магнитного поля. Уникальным преимуществом магнитных наночастиц является их управляемость при помощи внешнего магнитного поля. Относительно простая процедура связывания поверхности МЧ

с разнообразными биологически активными веществами обеспечивает их успешное применение для избирательного взаимодействия с клетками, клеточными органеллами, макромолекулами или любыми другими биологическими структурами, что также открывает самые широкие перспективы использования этих частиц.

Наиболее популярные, достаточно доступные и относительно недорогие частицы, широко применяемые в биологии и медицине, состоят из ферромагнитного или парамагнитного ядра и имеют калиброванные контролируемые размеры от нескольких нанометров (НМЧ) до нескольких микрон (ММЧ), обычно с очень небольшим разбросом по диаметру. Достижения в области нанотехнологии позволяют синтезировать МЧ из разнообразных материалов с заданными свойствами, оптимальными для решения конкретных задач. Например, на практике МЧ успешно используют в различных биосенсорах для диагностики, а также для клеточного сортинга (метод иммуномагнитной сепарации клеток), для выделения и очистки биологически активных веществ из сложных смесей, для адресной доставки лекарств в зоны патологии, для локальной магнитной гипертермии при лечении злокачественных опухолей.

Эти методы основаны на общем принципе, который можно схематически описать следующим образом. Поверхность специально подготовленной для этого МЧ химически связывают с биологически активным компонентом, имеющим высокое специфическое сродство к определённым биологическим объектам-мишеням (т. е. такие МЧ функционализируют), что обеспечивает способность конъюгировать между собой мишени и МЧ. Очень важно, что магнитные свойства частиц в образовавшихся конъюгатах делают эти последние магнитоуправляемыми; тот же принцип положен в основу выделения клеточных органелл, белков, пептидов и нуклеиновых кислот. Функционализированные МЧ должны иметь небольшой магнитный момент, чтобы они не агрегировали между собой до взаимодействия с биологическим объектом, эти частицы должны обладать супермагнетизмом, который позволит им иметь минимальную остаточную намагниченность после воздействия неоднородного магнитного поля. Таким образом, МЧ могут одновременно и маркировать биологические молекулы, и являться их переносчиками.

Размеры ММЧ и НМЧ сопоставимы с размерами клеток (10–100 мкм), вирусов (20–450 нм), макромолекул белков или нуклеиновых кислот. В настоящее время наиболее отработанной является технология использования МЧ в биосенсорных устройствах.

В последние годы всё более широкое распространение получает метод магнитной сортировки клеток при помощи суперпарамагнитных частиц, главным образом нано- или микрометровых шариков, хотя с успехом могут использоваться МЧ другого размера и другой формы.

Интересный пример использования НМЧ для клеточной сепарации — удаление из смешанной клеточной суспензии популяции клеток, склонных к раннему апоптозу — клеточной смерти. Для этого НМЧ функционализировали белком аннексином. Он представляет собой Са-зависимый белок, имеющий высокое сродство к фосфолипиду фосфатидилсерину и, соответственно, хорошо связывающийся с ним. В нормальных клетках этот фосфолипид локализован на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны и не доступен функционализированным НМЧ. В клетках, склонных к апоптозу, фосфатидилсерин имеет аномальную локализацию и находится на внешней поверхности цитоплазматической мембраны, поэтому НМЧ, функционализированные аннексином, связываются с такими клетками, за счёт чего их можно выделить и удалить из суспензии.

Многообещающие результаты при лечении ряда заболеваний даёт использование парамагнитных НМЧ и нанометровых магнитолипосом, когда их применяют как своеобразные магнитоуправляемые «контейнеры» для адресной доставки и иммоби-

лизации в нужной зоне биологически активных агентов. Особую важность эти свойства имеют для диагностики и лечения онкологических заболеваний. Как правило, опухолевые клетки имеют поверхностные антигены, отличающиеся от антигенов нормальных однотипных клеток. За счёт этой разницы НМЧ, функционализированные антителами против таких антигенов опухолевых клеток, связываются с опухолевыми клетками и не связываются с нормальными. Противоопухолевые препараты или радионуклиды могут быть присоединены к «магнитным контейнерам», называемым «magnetic target carrier» (MTC). Такой магнитный комплекс в форме магнитной жидкости вводится в артерию, снабжающую кровью поражённый орган или опухоль, или, если это возможно, инъецируется непосредственно в опухоль. Далее нужная зона подвергается воздействию внешнего магнитного поля со строго определёнными параметрами. В итоге, за счёт сродства к поверхностным антигенам опухоли и парамагнитных свойств, НМЧ локализуются на поверхности опухолевых клеток.

В настоящее время активно разрабатывается технология получения МЧ для локальной магнитной гипертермии раковых опухолей. Для этого применяют термочувствительные в магнитном поле НМЧ, хорошо удерживающиеся магнитным полем в органе-мишени и являющиеся малотоксичными для организма. Такие НМЧ трансформируют энергию переменного магнитного поля в тепло и таким образом вызывают нагревание ткани в зоне своего местонахождения. Чтобы обеспечить выход лекарственного препарата в область онкологического поражения, используют способность НМЧ нагреваться под действием переменного внешнего магнитного поля определённой силы и направления. Используют термочувствительные в магнитном поле НМЧ, обладающие температурой магнитного фазового перехода (точка Кюри). На практике это значит, что при более высокой температуре они перестают быть магниточувствительными и внешнее магнитное поле на них не действует.

Известно, что опухолевые клетки заметно больше подвержены действию гипертермии, чем нормальные, и при повышении температуры увеличивается их чувствительность к противоопухолевым препаратам. В данном случае использование «НМЧ-контейнеров» обеспечивает и локальную регулируемую гипертермию зоны опухоли (нагревание частиц под воздействием магнитного поля до 42–45 °С, иногда даже до 47 °С, и поступление в эту зону лекарственного фармакологического или радиоактивного противоопухолевого препарата. Необходимо подчеркнуть, что при вышеописанном способе лечения удаётся в большой степени избежать или существенно снизить тяжёлые побочные эффекты, всегда сопровождающие противораковую терапию. В опытах на животных показано, что использование метода адресной доставки МЧ обеспечивает 8-кратное локальное увеличение содержания лекарственного препарата в поражённых тканях после введения всего одной трети дозы, обычно вводимой при стандартном способе введения. Хотя использование МЧ для гипертермии раковых опухолей известно уже не менее 10 лет, основные результаты в этой области получены в экспериментах на животных.

Как было отмечено выше при обсуждении вопроса о магнитной сепарации клеток, следует учитывать, что при использовании НМЧ или магнитолипосом необходимо тщательно изучить влияние самих магнитных частиц на здоровье пациентов и контролировать отсутствие токсического действия самих частиц, что само по себе является непростой задачей. Как минимум, размер, форма и состав МЧ не должны препятствовать кровотоку, они не должны слипаться друг с другом и с форменными элементами крови, должны достаточно быстро подвергаться эндоцитозу, разрушаться в лизосомах и выводиться из организма (считается, что срок «жизни» МЧ в организме не должен превышать 10 дней). Есть данные, что достаточно щадящей процедурой может быть введение в кровоток НМЧ из окиси железа γ-Fe_2O_3 (SPIO — small paramagnetic iron oxide) в липосомальной форме или покрытых золотом. Золотое

покрытие облегчает последующую функционализацию НМЧ, которые должны быть достаточно мелкими (от 10 до 300 нм), улучшает их биосовместимость с клетками и тканями.

Пока получено относительно немного конкретных данных о применении МЧ для лечения онкологических больных, несмотря на оптимистические результаты в опытах *in vivo* на животных и на клеточных культурах. Очень хорошие результаты даёт применение гипертермии НМЧ при лечении меланомы у мышей. На золотистых хомячках зарегистрирована положительная динамика после лечения привитой остеосаркомы катионными магнитолипосомами, нагруженными противораковым препаратом доксорубицином. В клетках опухолей зарегистрировано 4-кратное увеличение концентрации лекарства по сравнению с его концентрацией при традиционном способе введения; отмечен регресс опухолей и заметное уменьшение количества метастазов.

В настоящее время имеется множество данных, посвящённых конструированию и успешному применению магнитоуправляемых носителей в биологии и медицине. Прогресс в этой области, пограничной между физикой, химией, биологией и медициной, должен поддерживаться дальнейшим развитием техники, особенно магнитосенсорной, способной определять микроколичества магнитных меток, а также расширением списка рецептирующих молекул, использующихся для функционализации МЧ. Комбинация магнитных нанотехнологий и биологомедицинских наук будет несомненно одной из ведущих прогрессивных областей исследования и применения в XXI веке.

Наличие у наночастиц оксида железа парамагнитных или суперпарамагнитных свойств оказалось очень полезным для их использования в качестве магнитно-резонансных контрастных средств (МРКС) при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) — одного из ведущих методов неинвазивной диагностики широкого спектра заболеваний внутренних органов. Наряду с совершенствованием магнитно-резонансных томографов и математического обеспечения продолжается разработка новых МРКС, в особенности тех, которые обладают органотропностью и безопасностью. МРКС, изменяя параметры протонов в тканях и органах, значительно повышают контрастность изображения, увеличивая диагностическую информативность МРТ [5]. Первыми МРКС, внедрёнными в клиническую практику, стали гадолиний-содержащие вещества. Их недостатком оказалась возможность развития нефрогенного системного фиброза у больных с почечной недостаточностью и воспалительными заболеваниями [6–8].

При поиске других МРКС исследователи обратили внимание на наночастицы оксида железа, обладающие достаточной контрастирующей способностью. Среди железосодержащих МРКС выделяют: SPIO — суперпамагнитный оксид железа; USPIO — суперпарамагнитный оксид железа в виде ультрамалых частиц и MION — монокристаллический оксид железа.

Препараты SPIO ($Fe_2^{3+}O_3$) имеют кристаллическую структуру и сильно ускоряют протонную релаксацию тканей. Диаметр частиц SPIO меньше эритроцита, что позволяет им проникать через капиллярную сеть. Разработанные препараты SPIO имеют необходимые величины заряда и размера для избирательного поглощения клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). После деградации SPIO в РЭС атомы железа включаются в состав гемоглобина эритроцитов. Количество железа, поступающего в организм в составе SPIO при диагностике, значительно ниже общей величины депо железа.

Препараты SPIO относятся к тканеспецифическим МРКС, имея тропность к РЭС и позволяя контрастировать печень, селезёнку и костный мозг. Они улучшают визуализацию диффузных и очаговых поражений селезёнки, а также позволяют дифференцировать лимфатические узлы с метастазами от нормальных. Частицы су-

перпарамагнитного оксида железа обеспечивают получение ценной диагностической информации при злокачественных опухолях печени, а также при наличии гемангиом, кист, узловых гиперплазий. Железосодержащий препарат эндорем (ферумоксид) позволяет выявлять метастазы в печени в 95 % случаев. При циррозе печени происходит снижение поглощения эндорема печенью.

Имеется опыт применения SPIO для диагностики очаговых поражений печени у 900 больных. Чувствительность метода МРТ в сочетании с SPIO составила 93,8 %, а специфичность — 91,5 %. МРТ в сочетании с SPIO позволяет получить хорошую визуализауцию опухолей костного мозга и дифференцировать опухолевые очаги от участков гиперплазий.

Наночастицы оксида железа UPSIO размера менее 20 нм предназначены для МР-ангиографии у человека. Препарат AMI-277 (синерем) улучшал визуализацию почечной артерии и правой коронарной артерии. Кроме того, с помощью AMI-277 удалось визуализировать аорту, нижнюю полую вену и воротную вену у 16 больных течение 45 мин.

С помощью вещества NC100150 (кларискан) можно проводить коронарную МР-ангиографию и получать изображение центральных, сегментарных и субсегментарных артерий. При использовании UPSIO в виде болюса для перфузионных исследований не обнаружено каких-либо побочных реакций. Наночастицы суперпарамагнитного оксида железа UPSIO помогают выявлять ишемические поражения головного мозга на ранних стадиях, идентифицировать участки ишемии миокарда, оценивать функцию почек и их гемодинамику.

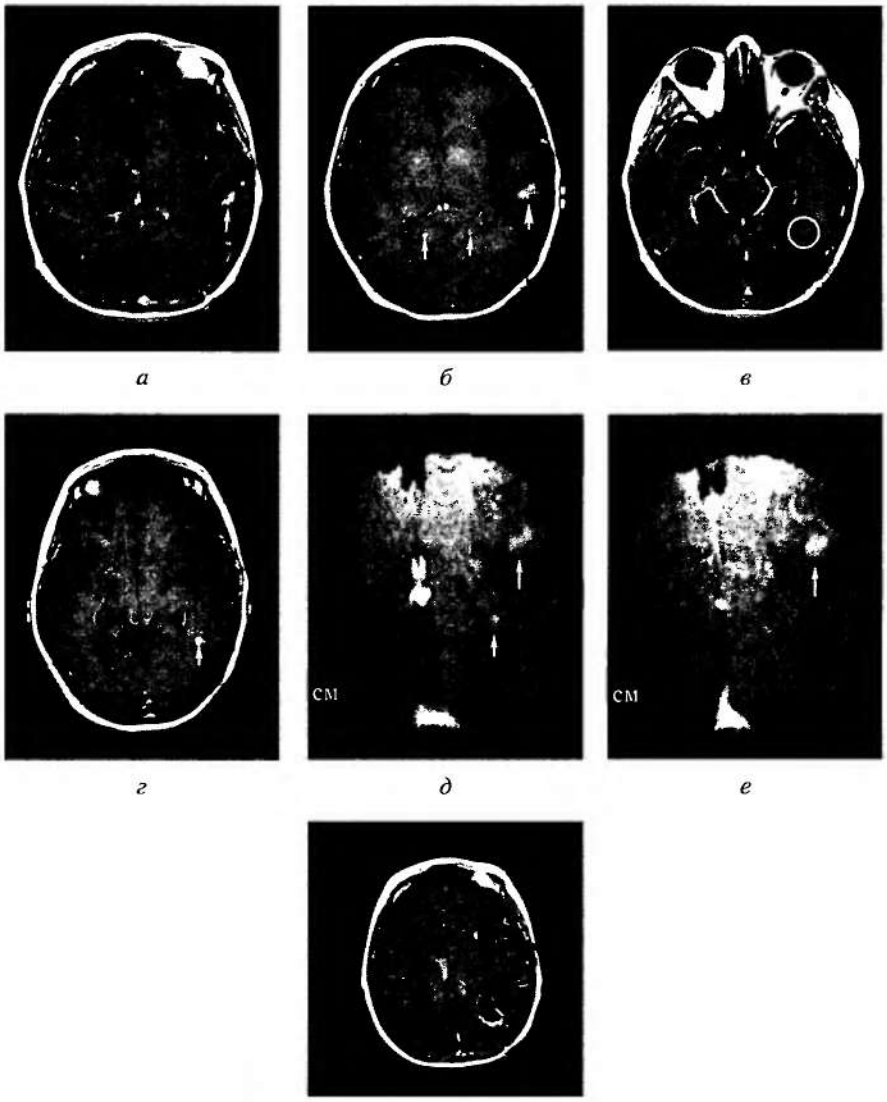
Согласно данным E. A. Neuwelt и др. (2004), наночастицы оксида железа, покрытые декстраном и названные ферумокстраном (Комбидекс) обладают выраженной контрастирующей способностью на T_1- и T_2-взвешенных МРТ-изображениях даже при низкой напряжённости магнитного поля 0,15 Тл. Авторы показали, что ферумокстран позволяет получать изображения опухолей в головном мозге пациентов лучшего качества, чем гадолиниевые МРКС. Наночастицы оксида железа накапливались в астроцитах и макрофагах, но не опухолевых клетках. У пяти из семи пациентов ферумокстран позволил выявить дополнительные очаги злокачественных образований по сравнению с препаратами гадолиния.

После введения ферумокстрана увеличение T_1-сигнала наблюдалось в течение 2–5 дней, что является несомненным преимуществом по сравнению с препаратами гадолиния, контрастирующий эффект которых исчезает через 40 мин — 1 ч. Кроме того, ферумокстран оказывал контрастирующий эффект и при световой и даже электронной микроскопии образцов, полученных для гистологического исследования. Очень важно, что после операции оставшиеся очаги заболевания контрастируются ферумоксатраном через день после операции и более за счёт длительно времени полувыведения препарата (рис. 17.9).

Через 5 месяцев на T_1-взвешенном изображении введение гадолиниевого препарата позволило увидеть новые опухолевые очаги, которые не были видны после первоначального сканирования на рис. 17.9, *а* и *в*.

Важно, что три новых очага, контрастируемых гадолинием (стрелки), образовались в областях, которые контрастировались ферумокстраном, но не гадолинием (рис. 17.9, *б* и *г*).

Для создания органототропных МРКС на основе частиц суперпарамагнитного железа можно использовать их конъюгаты со специфическими антителами. В частности, имеются данные о возможности идентификации инфаркта миокарда с помощью антимиозиновых антител, конъюгированных с монокристаллическим оксидом железа (MION).



а *б* *в* *г* *д* *е* *ж*

Рис. 17.9. *а* — T_1-взвешенное изображение после введения препарата гадолиния (стрелкой указано небольшое опухолевое образование в левой височной доле); *б* — T_1-взвешенное изображение через 24 ч после введения ферумокстрана позволяет видеть большой очаг в левой височной доле и дополнительно маленькие очаги позади splenium (маленькие стрелки); *в*, *г* — через 24 ч после введения ферумокстрана визуализируется новый очаг в задней левой височной доле (маленькая стрелка); *д* — через 25 ч после введения ферумокстрана на T_1-взвешенном изображении на МР-томографе с напряжённостью 0,15 Тл (PoleStar N-10, Odin Medical Technologies, Yokneam Elit, Израиль) видны 2 больших очага в левой височной доле (стрелки). Дополнительно видны 2 маленьких очага позади (см. рис. *б*); *е* — через 5 месяцев на T_1-взвешенном изображении введение гадолиниевого препарата позволило увидеть новые опухолевые очаги, которые не были видны после первоначального сканирования на рис. *а* и *в*. Важно, что эти три новых очага, контрастируемых гадолинием (стрелки), образовались в областях, которые контрастировались ферумокстраном, но не гадолинием, ранее на рис. *б* и *г*

Наночастицы железа USPIO можно использовать для целей МР-ангиографии, а также для оценки стадии заболевания раком молочной железы.

Препараты SPIO, имеющие сравнительно большие размеры частиц, предназначены для контрастирования желудочно-кишечного тракта. Обычная доза SPIO (900 мл) для контрастирования всего кишечника хорошо переносится. По сравнению с другими МРКС острая и хроническая токсичность SPIO или USPIO у животных выражена в меньшей степени. В дозе, превышающей диагностическую в 100 раз, SPIO не вызывал видимых изменений в органах и тканях у экспериментальных животных.

Анализ литературы по железосодержащим МРКС позволяет заключить, что эти препараты имеют большие перспективы для клинического применения в качестве органотропных МРКС и можно ожидать расширения показаний для их применения и создания новых эффективных и безопасных контрастно-диагностических средств.

Наночастицы оксида железа можно использовать для мечения стволовых или раковых клеток. В первом случае с их помощью можно следить за миграцией введённых в организм стволовых клеток, а во втором — за метастазированием.

Превращение раковых клеток в минимагниты с использованием наночастиц может сделать биопсию настолько точной и эффективной, что не будет необходимости повторять эту болезненную процедуру. Идея заключается в использовании наночастиц оксида железа, покрытых биологически совместимым материалом и антителами, которые вступают в реакцию с химическими веществами, встречающимися только в раковых клетках. При попадании в организм тысячи частиц прилипают к раковым клеткам, превращая их в миниатюрные магниты. В результате клетки притягиваются к магнитам, находящимся на кончике иглы для биопсии. Математическая модель системы подтвердила, что игла может притягивать за две–три минуты значительное число раковых клеток, нагруженных наночастицами. В лабораторных условиях исследователи продемонстрировали, что намагниченная игла может притягивать клетки, заражённые лейкемией, окружённые наночастицами и находящиеся в крови или другом растворе, имитирующем тканевые жидкости. Результаты биопсии могут быть двояки: иногда они могут быть негативными только потому, что в исследуемом образце слишком мало злокачественных клеток, а не потому, что болезнь исчезла без следа. Теперь исследователи нашли решение, основанное на силе магнитного притяжения. Эта технология может быть полезной для больных лейкемией, которым необходимо регулярно делать биопсию костного мозга для выявления остаточных признаков болезни. Технология позволяет также выявлять злокачественные клетки из грудной клетки, простаты, яичников, которые попали в другие части тела в слишком ничтожных количествах для обнаружения их с помощью обычной иглы.

Другое клиническое использование наночастиц оксидов металлов основано на их способности аккумулировать магнитное или фотонное изучение и затем превращать его в другие виды энергии, например тепловую, которая приводит к деструкции опухоли или микробных клеток. Для борьбы с патогенами предложено использовать фототермическую терапию. Для этой цели были получены магнитные наночастицы оксида железа, покрытые SiO_2 и обработанные ультразвуком, чтобы предотвратить агрегацию наночастиц. Образовавшиеся при этом наночастицы по форме напоминали яйцо. Затем на поверхности этих частиц был выращен слой золота: сначала добавили «золотые зародыши», которые прилипли к поверхности частиц, а потом поместили частицы в раствор, содержащий $HAuCl_4$. Цвет раствора при этом изменился с бледно-розового на тёмно-зелёный, а частицы сохранили форму яйца; в дальнейшем такие частицы стали называть «нанояйцами». Было показано, что бактерии в присутствии таких нанояиц образуют конгломераты во внешнем магнитном поле за достаточно малое время. Чтобы нанояйца связывались с поверхностью бактерий более эффективно, к ним был пришит ванкомицин. Это вещество представляет собой антибиотик, инги-

битор синтеза клеточной стенки бактерий, но в данном случае главную роль играла его способность связываться с определёнными пептидными структурами на бактериальной поверхности. Модифицированные ванкомицином наночастицы связываются как с ванкомицин-неустойчивыми, так и с ванкомицин-резистентными штаммами самых различных бактерий. Под воздействием внешнего магнитного поля бактерии образовывали агрегаты и теряли способность к размножению. При их последующем облучении лазером (808 нм) в течение 3 мин возникала гипертермия, и более 99,5% бактерий погибало в течение 15 мин. При тех же условиях выживало более 80% клеток млекопитающих (показано на примере клеток карциномы человека).

Следует отметить, что контроль и измерение температуры нагрева онкологической области при магнитно-резонансной термотерапии может производиться по значению частоты излучения используемых наночастиц, которая лежит в диапазоне миллиметровых длин волн. Принципиально новым, для решения данной задачи, является использование наночастиц, конъюгированных с молекулами-носителями (антителами). Проведённые нами расчёты и экспериментальные данные по изучению поведения наночастиц металлов, находящихся в конденсированных средах, при взаимодействии с электромагнитным излучением (ЭМИ), показали, что существует резонансная частота поглощения ЭМИ, которая зависит как от природы и геометрического размера наночастиц, так и от размера поражённой области [9, 10].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) широко применяются для диагностики и лечения раковых опухолей. В этих двух подходах необходимо введение в организм некоторых специальных веществ: в случае ФДТ это красители (сенсибилизаторы), которые вызывают формирование активных форм кислорода в ответ на облучение светом; для МРТ необходимы контрастирующие средства, такие как суперпарамагнитные частицы оксида железа. Кроме того, красители для ФДТ часто бывают токсичны для клеток сами по себе; в этом случае их заключают в частицы из биосовместимого материала, например диоксида кремния.

Полученные результаты открыли возможность сконструировать универсальные частицы, пригодные как для магнитно-резонансной томографии, так и для фотодинамической терапии. Проблема состоит в том, что обычно наночастицы тушат люминесценцию красителя для ФДТ и, видимо, его способность генерировать активные формы кислорода. Как показали экспериментальные данные, в случае использования комплексов иридия(III) такого тушения не происходит. При этом сферические суперпарамагнитные частицы оксида железа размером 12 нм были покрыты диоксидом кремния (получились частицы диаметра 55 нм), в порах которого находилось комплексное соединение иридия(III) [Ir-(piq)2(ppTES)]-((EtO)3Si). Такие частицы сохраняли и магнитные свойства, и способность к люминесценции. Исследователи рассмотрели действие этих многофункциональных частиц на клетки рака шейки матки человека, HeLa. Клетки накапливали наночастицы, которые сами по себе оказались нетоксичны: выживало около 100% клеток.

Интересно отметить, что из оксида железа можно получать полые наноструктуры, которые пользуются особым вниманием благодаря возможности внедрения различных веществ. Исследователи предложили для получения полых наночастиц оксида железа экранировать прекурсор во время отжига слоем диоксида кремния. Путём гидролиза $FeCl_3$ сначала получают наночастицы β-FeO(OH). Затем они покрываются слоем диоксида кремния и отжигаются, вследствие чего формируются частицы гематита с полостью. SiO_2 удаляется при обработке NaOH, и получаются частицы гематита с полостью. Если до удаления оболочки провести отжиг в восстановительной атмосфере, то образуется магнетит. Полость образуется из-за сильной адгезии между частицами оксида железа и внутренней поверхностью оболочки SiO_2. При отжиге β-FeO(OH) без оболочки формирующиеся из-за разложения поры быстро схлопы-

ваются. Веретёнообразные частицы имеют диаметр около 15 нм и длину около 70 нм, толщина стенки составляет 5 нм. Они хорошо диспергируются в воде и образуют стабильные коллоидные взвеси. Частицы из Fe_3O_4 проявляют суперпарамагнитное поведение. Исследователи показали, что полые частицы могут использоваться для доставки лекарств.

Достаточно много исследований проводится и с наночастицами других металлов. В частности, большие перспективы имеются у частиц золота, которые можно получать различных размеров и тем самым регулировать их накопление в живых клетках. Для исследования были взяты клетки рака молочной железы человека, суперэкспрессирующие рецептор HER2 (клетки рака молочной железы в 20–30% случаев имеют такие рецепторы), а к наночастицам присоединили трастузумаб, представляющий собой рекомбинантные человеческие моноклональные антитела, которые селективно взаимодействуют с внеклеточным доменом белка, являющимся рецептором к эпидермальному ростовому фактору человека (HER2). Чтобы проверить, как размер частиц влияет на поведение клеток, были получены коллоидные золотые наночастицы размерами от 2 до 100 нм. При добавлении к ним трастузумаба формировались комплексы трастузумаб–наночастица, достаточно стабильные в условиях эксперимента. Было показано, что клетки более охотно накапливают наночастицы размерами от 25 до 50 нм. Проследив судьбу обработанных наночастицами раковых клеток, учёные обнаружили, что те погибают по пути апоптоза («самоубийства») именно в случаях, когда размер наночастиц составляет 25–50 нм. Обработка наночастицами других размеров даёт эффект, сравнимый с воздействием трастузумаба самого по себе, тогда как наночастицы размером 25–50 нм усиливают действие препарата почти в два раза. Обработка же «чистыми» (не содержащими трастузумаб) наночастицами диаметром 40 нм не оказывает на выживаемость клеток практически никакого влияния.

Сочетание нанотехнологии и генной терапии может дать ряд преимуществ при лечении различных заболеваний, а для этого необходимо научиться доставлять к клеткам и гены, и наночастицы одновременно. Группа учёных из Университета Алабамы в Бирмингеме и Калифорнийского университета (США) разработала способ, как связать золотые наночастицы и вектор на основе аденовируса генов для внедрения в клетки млекопитающих. Важно отметить, что присоединение к аденовирусному вектору наночастиц не ухудшило эффективность доставки генов. Исследователи воспользовались способностью участка связывания никелевой соли нитрилтриуксусной кислоты (Ni-NTA) связываться с шестью идущими подряд остатками гистидина (6xHis). При этом частицы золота размером 1,8 нм несли по 15–20 групп NTA-Ni(II), а капсид аденовируса — шестигистидиновые фрагменты. Капсид состоит из нескольких типов белковых субъединиц, поэтому был присоединён фрагмент 6xHis к каждому из белков. Как оказалось, лучше всего модифицировать белок гексон: во-первых, число субъединиц этого белка наибольшее, а во-вторых, его изменение не сказывается на эффективности передачи генов. Полученные частицы были успешно испробованы на клетках HeLa. Аденовирусную систему доставки генов можно легко заменить лентивирусной, золотые наночастицы — магнитными частицами или квантовыми точками, а взаимодействие Ni–NTA и 6xHis — например, системой биотин–стрептавидин.

Ещё одним видом наночастиц являются частицы диоксида кремния, которые можно использовать для терапии монооксидом азота, необходимым для противомикробного действия макрофагов. Сам организм, наряду с прочими способами борьбы с вторжением микробов, использует оксид азота NO, который вырабатывают макрофаги и другие клетки воспалительного ответа, но его не всегда бывает достаточно. К молекулам оксида азота чувствительны как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, причём необходимая концентрация газообразного NO, которая

является смертельной для микробов, безопасна для клеток млекопитающих. Однако задача состоит в избирательной доставке нужного количества NO в макрофаги для уничтожения бактерий. Исследователи из университета Северной Каролины (США) нашли способ, как заключить NO в наночастицы диоксида кремния. Такие частицы размером 136 нм имеют ряд преимуществ по сравнению с низкомолекулярными источниками NO — это прежде всего, большее время высвобождения оксида азота, который, к тому же, требуется в меньших концентрациях. Учёные показали, что созданные ими наночастицы эффективны для борьбы с синегнойной палочкой *in vitro*. Кроме того, ни сами по себе частицы, ни выделяемый ими оксид азота не наносят вреда другим клетками (например, фибробластам).

17.5. Наночастицы соединений кальция для лечения заболеваний костей

Заболевания костных тканей и пародонта, обусловленные нарушением кальциевого обмена в организме, являются актуальной проблемой практической медицины. В частности, по данным Всемирной организации здравоохранения, остеопороз признаётся глобальной проблемой здравоохранения, занимает четвёртое место среди неинфекционных заболеваний, уступая заболеваниям сердечно-сосудистой системы, онкологической патологии и сахарному диабету, и напрямую связывается с качеством и продолжительностью жизни [1]. В России, согласно имеющимся статистическим данным, в 50-летнем возрасте диагноз остеопороз прогнозируется более чем у 20% мужчин и почти у трети женщин [2]. Причём в последние годы костные и стоматологические заболевания, которые являются естественными для людей пожилого возраста вследствие нарушения кальциевого обмена в стареющем организме, во всё возрастающей степени касаются и детей. Причинами развития подобной патологии являются изменение образа жизни, ухудшение экологии, качества пищевых продуктов, другие побочные явления развития человеческой цивилизации, которые в целом сказываются как на внутриутробном, так и последующем развитии ребёнка.

Определяющую роль в профилактике и лечении указанных выше заболеваний играют препараты кальция. Кальций и его соединения относятся к фармакологической группе минеральных веществ, которые, наряду с витаминами и другими биологически активными веществами, являются обязательными элементами, обеспечивающими нормальное течение процессов жизнедеятельности организма человека. Кальций играет многогранную роль в жизнедеятельности организма: участвует в передаче нервных импульсов, поддержании тонуса скелетной и гладкой мускулатуры, функционировании миокарда, процессах свёртывания крови и других физиологических процессах, образовании и сохранении целостности костной ткани.

Различные патологические процессы, в том числе тетания, дисфункция скелетной и гладкой мускулатуры, сердечно-сосудистой системы, нарушение свёртывания крови, остеопороз, многие тяжёлые стоматологические заболевания являются проявлениями недостатка кальция в организме.

Однако биодоступность и, следовательно, эффективность имеющихся в настоящее время пищевых добавок, лечебно-профилактических средств и лекарственных препаратов кальция, несмотря на их разнообразие и многочисленность, недостаточны для проведения эффективной профилактики и лечения заболеваний, связанных с дефицитом кальция в организме.

Как в России, так и за рубежом существует признанный дефицит эффективных и доступных для населения лекарственных препаратов, лечебно-профилактических средств и биологически активных веществ, содержащих кальций. Проблема их

создания до сих пор остаётся актуальной и имеет глобальную социальную и экономическую значимость. Имеющийся в ряду других известных содержащих кальций препаратов официнальный препарат кальция глюконат в кристаллической форме с ограниченной растворимостью в воде также обладает малой биоусвояемостью и незначительным терапевтическим эффектом при профилактике и лечении заболеваний, связанных с недостатком кальция в организме. Для лечения же тяжёлых костных и стоматологических заболеваний он признаётся неэффективным и практически бесполезным. Поэтому не случайно, что при разрешении проблем поиска эффективных лекарственных средств для борьбы с остеопорозом учёные обратились к нанотехнологиям.

Для получения биоусвояемой формы кальция глюконата был использован метод механоактивации, который в настоящее время является известным и признанным методом модификации лекарственных препаратов. Особенно важным при этом является то, что при механо-химическом модифицировании имеется возможность изменения реакционной способности и биологической активности известного официнального лекарственного вещества, терапевтические характеристики которого и возможные побочные эффекты (в том числе и отдалённые) хорошо известны [3]. Поэтому особый интерес представляют механо-химически модифицированные лекарственные препараты кальция, предназначенные для консервативного лечения заболеваний, обусловленных нарушением кальциевого обмена в организме.

Н. С. Стрелков и др. [10] применили нанотехнологии для получения нанодисперсного рентгеноаморфного механоактивированного кальция глюконата (МАКГ), отличающегося улучшенной биоусвояемостью. При механохимическом модифицировании имеется возможность изменения реакционной способности и биологической активности известного официнального лекарственного вещества глюконата кальция. Известны способы получения гидроксиапатитных наносоединений кальция, которые используются в хирургической стоматологии и в качестве трансплантатов при оперативном лечении костных тканей.

Проведённые комплексные всесторонние физико-химические исследования полученной модифицированной формы препарата не обнаружили каких-либо изменений элементного химического состава и критических химических превращений с образованием принципиально новых соединений. Клиническая апробация МАКГ показала его эффективность для лечения гипокальциемии и сложных костных и стоматологических заболеваний. Установлена эффективность препарата при лечении гипокальциемии и остеопоротических заболеваний у детей в возрасте от 4 месяцев до 16 лет. У всех без исключения детей с гипокальциемией, диспластическими и дегенеративно-дистрофическими процессами тазобедренных суставов, дефектами костных тканей нормализовался уровень кальция в крови, восстановились анатомические взаимоотношения костей в суставах, произошло заполнение полостей и восстановление структуры костной ткани, что позволило избежать инвалидизации и плановых оперативных вмешательств. У детей с рецидивом после оперативного лечения дефектов костной ткани и необходимостью проведения повторных операций применение МАКГ позволило исключить радикальные хирургические методы лечения.

Была выявлена значительно превышающая, чем у известных лекарственных препаратов кальция, эффективность МАКГ при лечении заболеваний пародонта (хронический гранулематозный периодонтит в стадии обострения, хронический пародонтит 3-й степени тяжести и т. п.). После комплексного лечения с применением МАКГ в течение 1–2 месяцев исчезали кровотечение, болевой синдром, подвижность зубов и происходило активное замещение гранулематозной ткани и периодонтальной щели нормальной костной структурой. Пародонтит тяжёлой 3-й степени переходил в лёгкую 1-ю степень.

Были получены предварительные клинические данные по применению МАКГ для лечения таких остеопоротических заболеваний у взрослого и пожилого населения, как: гипокальциемия, многооскольчатые переломы, разрушение суставов стопы, системный остеопороз. С применением МАКГ у пациентов наблюдали явное клиническое улучшение, исчезали болевой синдром, хромота и необходимость использования опорной трости. Рентгенологически и денситометрически выявлено сращение отломков, увеличение плотности костной ткани и уменьшение степени остеопоротической патологии.

При этом эффективность препарата сохранялась для пациентов всех возрастных категорий — до 70 лет и выше.

Наночастицы соединений кальция можно получить тремя способами, а именно диспергированием макрочастиц исходного вещества, путём выделения наночастиц из пересыщенного твёрдого или жидкого раствора, а также путём конденсации пара. Совокупность последовательных явлений, реализующихся при первом способе, можно назвать фрагментационным, а при втором и третьем способе — конденсационным путём физико-химической эволюции вещества. Оба пути пригодны для получения множества наноразмерных лекарственных веществ.

Обычно при реализации фрагментационного пути множество макротел подвергают достаточно длительному механическому нагружению, при котором в области контакта тел образуются зоны повышенного содержания точечных дефектов и дислокации. Эти дефекты перемещаются в объёме каждого тела, а когда его дефектность превышает некоторое пороговое значение, то точечные дефекты собираются в двумерные скопления, что приводит к появлению блочной структуры в объёме тела. Со временем размер блоков уменьшается, а границы между ними, где собираются точечные дефекты, расширяются до макротрещин. Это приводит к отделению блоков от тел, причём отделившиеся фрагменты продолжают накапливать дефекты и распадаются на более мелкие фрагменты. По мере уменьшения размера фрагментов становится всё более заметной ликвидация точечных дефектов и дислокаций на поверхности, в результате чего интенсивность фрагментации тел снижается. Размер фрагментов приближается к предельному значению, зависящему от интенсивности механического нагружения. При достаточной интенсивности нагружения вещество переходит в нанодисперсное состояние. Оно состоит из высокодефектных фрагментов нанометрового размера, поверхность которых столь же дефектна, как их объём. При непрерывном нагружении их дефектность непрерывно возобновляется и они удерживаются в нанодиапазоне размеров. Но когда нагружение завершается, то начинается упорядочивание фрагментов.

Неравновесные точечные дефекты и дислокации мигрируют из объёма фрагментов к их поверхности, где аннигилируют. Поверхность фрагментов сглаживается, и они превращаются в полиэдры; полиэдры слипаются друг с другом и срастаются в агломераты. Границы между фрагментами в агломератах залечиваются, и они превращаются в блочные кристаллы, а затем в монокристаллы. Одновременно с этим вещество подвергается Оствальдову созреванию, при котором более устойчивые крупные фрагменты и агломераты поглощают вещество более мелких и потому менее устойчивых частиц. Перечисленные процессы приводят к выходу вещества из нанодисперсного состояния, причём время пребывания вещества в данном состоянии определяется интенсивностью агломерации и Оствальдова созревания.

Из изложенного следует, что в процессе фрагментационного пути получения наночастиц реализуется смена стадий дефектообразования в объёме тел, их распада на фрагменты, упорядочивания структуры фрагментов и их укрупнения путём образования агломератов и Оствальдова созревания.

Длительность каждой стадии можно варьировать действием различных физико-химических факторов, важнейшими из которых являются температура и используемые вещества — стабилизаторы фрагментов.

Снижение температуры приводит к замедлению миграции и аннигиляции дефектов, а также агломерации и Оствальдова созревания. Поэтому охлаждение вещества может привести к удлинению всех стадий данной технологии. К тому же эффекту приводят добавки, молекулы которых сорбируются на поверхности нанофрагментов и препятствуют их слипанию и срастанию, а возможно и аннигиляции дефектов. К стабилизации нанофрагментов приводит также перевод вещества в инертную жидкость, если слои адсорбированных молекул жидкости на поверхности фрагментов препятствуют аннигиляции и агломерации. Указанные факторы дают возможность, прерывая эволюцию вещества на разных стадиях, получить набор продуктов с различной дефектностью, размером и химическим составом фрагментов, а следовательно, с разной адгезионной способностью к биологическим тканям и скоростью поступления в кровоток. Данную возможность уже начали использовать для получения лекарственных веществ ускоренного действия. Накопленный опыт указывает на целесообразность разработки технологий, предполагающих использование регулируемой фрагментации с «закалкой» и «отжигом» дефектов для получения нанодисперсных лекарственных веществ разного назначения.

Конденсационный путь обычно реализуют путём смешивания растворов реагентов, химическая реакция между которыми приводит к целевому веществу, или путём охлаждения паров этого вещества, насыщенных при высокой температуре. В обоих случаях в среде образуются зародыши нанокристаллов, которые растут и объединяются в агрегаты, где затем они срастаются в агломераты. При росте нанокристаллы приобретают ростовую дефектность, а часто и ростовой заряд, которые со временем исчезают. Границы между нанокристаллами в агломератах «залечиваются», что может приводить к превращению агломератов в монокристаллы. Кроме того, происходит Оствальдово созревание целевого вещества. При этом, как правило, путь реализуется постадийно и свойства вещества в конце каждой стадии отличаются друг от друга не меньше, чем свойства разных веществ.

В качестве примера можно привести одно из немногих биосовместимых неорганических веществ — гидроксиапатит, предназначенный для лечения костной патологии. Если это вещество получают путём смешивания водных растворов реагентов, то уже в процессе смешивания в среде образуются квазижидкокристаллические плоские наночастицы, в объёме которых образуются ансамбли упорядоченных кластеров. Они разрастаются, что приводит к превращению исходных наночастиц в блочные пластинчатые нанокристаллы. Последние объединяются в агрегаты микронного размера, которые упорядочиваются и постепенно приобретают сфероидную форму. Эти первичные агрегаты значительно медленнее объединяются во вторичные агрегаты, причём в их объёме имеются поры двух видов, а именно зазоры между нанокристаллами и пространства между первичными агрегатами, вошедшими в объём вторичных. Поэтому если растворы реагентов направлять в специальный смеситель, обеспечивающий скоростное смешивание, а затем переводить смесь в большой объём раствора, содержащего поверхностно-активные вещества, чтобы снизить скорость образования агрегатов, то можно прервать процесс эволюции гидроксиапатита на стадии образования нанокристаллов и получить коллоидные растворы, а затем суспензии и пасты с различным содержанием наногидроксиапатита. Если же смесь подавать в аппарат в определённом гидродинамическом режиме, то может быть ускорено образование первичных агрегатов, поры которых можно наполнить каким-либо лекарственным средством. Если суспензию из первичных агрегатов прогревать в определённом температурном режиме, то можно ускорить образование вторичных

агрегатов и получить бипористый продукт. Если же поры этого продукта заполнить разными лекарственными веществами, то вторичные агрегаты будут выполнять роль «контейнеров». Опыты указывают на то, что аналогичные возможности даёт множество других малорастворимых веществ.

После отделения наночастиц от маточной среды и переноса в среду использования наступает новый этап их эволюции. Они поглощают вещества новой среды, растворяются или испаряются, претерпевают фазовые превращения или вступают в топохимические реакции. Например, можно предположить, что при введении гидроксиапатита в область костного дефекта, который необходимо залечить, происходит частичное растворение пластинчатых нанокристаллов, сопровождающееся распадом первичных агрегатов, доминирующих в препарате. Нерастворившиеся пластинчатые нанокристаллы прилипают к остеобластам гранями, что стимулирует их функционирование. В области костного дефекта ускоряется «производство» коллагена. На «активных центрах» молекул коллагена зарождаются и растут новые нанокристаллы гидроксиапатита, которые после соприкосновения друг с другом срастаются в ламеллярные первичные агрегаты. В результате костный дефект «залечивается» намного быстрее. Данный результат является следствием правильного выбора момента прерывания эволюционного процесса получения препарата гидроксиапатита. Процесс был прерван в конце стадии образования первичных агрегатов, когда пластинчатые нанокристаллы не потеряли способность к быстрому растворению и не успели срастись в агломераты или образовать вторичные агрегаты, так что первичные агрегаты не потеряли свойства, благоприятные для быстрой регенерации костной ткани в области дефекта.

Удачным оказался выбор конструкции и режима работы реактора, в котором получали препарат гидроксиапатита — пасту Остим-100. В этом реакторе удалось обеспечить быстрое образование первичных агрегатов и медленное их объединение во вторичные агрегаты, что позволило сделать первичные агрегаты главной лечебной формой в препарате Остим-100. Иные требования к реактору появятся, если для залечивания дефекта использовать, например, карбонат кальция и раствор фосфата натрия. Конденсационный путь карбоната кальция близок к гидроксиапатиту, так что его можно получать в том же реакторе. Однако у карбоната стадия образования вторичных агрегатов короче, чем у гидроксиапатита, поэтому режим его работы целесообразно изменить так, чтобы замедлить вторичное агрегирование.

Судя по опыту уже реализованных производств нанолекарств и достижений химической технологии, направленное изменение целевых свойств наночастиц и агрегатов может быть выполнено в пределах одной системы аппаратов, предназначенной для производства множества продуктов. Этого можно достичь путём варьирования формы аппаратов, концентрации и расхода растворов реагентов, природы и режима ввода добавок, ускоряющих или замедляющих зарождение, рост и агрегирование нанокристаллов. Этому способствуют также акустические поля и механические воздействия, зонарное изменение температуры и тепловые удары, а если кристаллы заряжены или имеют заметный магнитный момент — электрические или магнитные поля.

Реализация конденсационного и фрагментационного путей физико-химической эволюции нанодисперсных лекарственных веществ соединений кальция открывает возможность получения множества лечебных препаратов разного назначения на одной технологической линии. Эти препараты, имея одинаковый макросостав, могут существенно различаться по размеру, форме, дефектности и микросоставу нанокристаллов и агрегидроксиапатитов. Чтобы выявить свойства нанокристаллов, наиболее соответствующие назначению каждого препарата, необходимо располагать информацией о закономерностях процессов, определяющих ту часть эволюционного пути, которая реализуется при использовании данного препарата. Конструкция же

и режим работы аппаратов определяется той частью эволюционного маршрута, которая реализуется при производстве препарата. Поэтому разработку нанотехнологии каждого лекарственного вещества следует начать с накопления информации о его полных эволюционных путях. Решение этой задачи обеспечено тем, что общие закономерности физико-химической эволюции нанодисперсных веществ уже установлены, а технические средства для реализации каждого пути уже разработаны.

В существующих моделях минерализации мягких тканей крови учитывается роль транспорта ионов кальция и фосфора. При рассмотрении механизма минерализации тканей следует учитывать, что гидроксиапатит может образовываться в результате спонтанной преципитации в плазме крови.

Основанием для такого вывода служит гидроксиапатит, по структуре подобный костному апатиту и гидроксиапатит кальцификатов клапанов сердца, который был обнаружен в сухих остатках крови здоровых доноров. Были проведены модельные эксперименты в регулируемых условиях ($T = 37$ °C, pH = 7,4) по ионному составу основных элементов (Ca, P, Mg и NaCl), близких к их содержанию в плазме крови. В качестве биологического компонента был использован основной белок крови — альбумин. На основе экспериментальных данных сделан вывод, что белки крови способствуют формированию нанокристаллов гидроксиапатита. Особая роль в этом принадлежит альбумину.

Минерализация органических тканей является необходимым условием существования человека и животных. Неорганическая часть костной ткани, зубов и патологических образований обычно представлена фосфатом кальция. Особый интерес по ряду наиболее значимых медицинских проблем представляет кальцификация сердечных клапанов, аорты, магистральных и коронарных артерий. Известно, что основным минералом костной ткани и многих твёрдых патологических образований человека и животных является гидроксиапатит — $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. В меньшей степени патологические образования представлены другими фосфатами кальция: октакальцийфосфатом — $Ca_8H_2(PO_4)_6{\cdot}5H_20$ и брушитом — $CaHPO_4{\cdot}2H_2O$. Исследования с использованием просвечивающей электронной микроскопии показали, что все они состоят в основном из кристаллов нанометрового диапазона, как и их синтезированные аналоги.

Поведение кальциевых фосфатов в живом организме определяется физико-химическими условиями зарождения и роста кристаллов, термодинамически регулируемым пересыщением и местными концентрациями органических макромолекул в биологических жидкостях. Тип биологической жидкости определяет окружение органических молекул, которые влияют на зарождение и рост кристаллов фосфата кальция. Однако до сих пор природа и химический состав биологических жидкостей, ответственных за физиологическую и патологическую минерализацию, остаются не выясненными. В основном, исследования были сориентированы на получение гидроксиапатитных соединений, которые используются в хирургической стоматологии и в качестве трансплантатов при оперативном лечении костных тканей.

В существующей модели костной минерализации образование нанокристаллов неорганической ткани происходит в матричных везикулах под контролем коллагена. По современным представлениям минерализация клапанов сердца и аорты также инициируется в матриксных везикулах с накоплением фосфата кальция и последующей кристаллизацией в виде гидроксиапатита. Как и в случае костной минерализации, часто считается предпочтительным первоначальное зарождение кислых фосфатов кальция с последующим преобразованием в более стабильный в условиях организма гидроксиапатит. При этом крови отводится роль транспорта ионов Ca и P, которые в межклеточных матричных везикулах, обладающих свойством мембран,

достигают концентрации, необходимой для образования гидроксиапатита или других фосфатов кальция.

Существующие представления определили и наиболее прорабатываемые схемы экспериментальных работ, которые по условиям синтеза более близки к формированию октакальцийфосфата. Однако ни одна из существующих гипотез не объясняет, как образуется плотный массивный кальцификат на отдельных минерализованных участках, во много раз превышающий объём органической ткани и минерализацию полимерных поверхностей протезов сердечных клапанов, соприкасающихся с циркулирующей кровью.

Возможен альтернативный механизм, когда гидроксиапатит образуется в плазме крови без промежуточных фаз. Основанием для существования такого механизма служат: а) исследования атомной структуры, морфологии и химического состава кальцификата на природных клапанах сердца и их биопротезах; б) обнаруженные нанокристаллы в крови и лимфе человека; в) экспериментальные результаты по моделированию ионного состава плазмы крови с участием основного белка — альбумина. В работе использовался интраоперационный материал — минерализованные аортальные и митральные клапаны сердца, полученные от пациентов с приобретёнными пороками сердца ревматического и септического генеза; минерализованные биопротезы (свиные), полученные при повторных операциях по замене сердечных клапанов пациентов.

Срок службы использованных биопротезов — от 16 до 2,5 лет.

У больных с минерализацией клапанов сердца, подтверждённой ультразвуковым методом, проводился забор крови. Исследовался сухой остаток плазмы крови. Для сравнения выполнялся аналогичный анализ крови донора и лимфы больного рассеянным склерозом. Следует отметить, что минерализация клапанов сердца обычно проходит при нормальных показателях концентрации кальция и фосфора в крови пациентов. Имеется принципиальное отличие по условиям образования массивного кальцификата минерализованных природных клапанов сердца и их биопротезов. В изученных природных клапанах сердца формирование кальцификата проходило внутри ткани клапана, а массивный кальцификат биопротезов образовывался на створках клапана непосредственно в кровотоке.

Изучение минерализованных участков природных клапанов сердца показало, что кальцификаты представлены агрегатом мелкодисперсных частиц, формирующих более крупные образования различной плотности. Плотные образования чаще наблюдаются в клапанах высокой степени минерализации, где форма отдельных частей крупных кальцификатов сантиметрового диапазона напоминает поверхность монокристаллов. Более рыхлые образования имеют глобулярное строение с величиной глобул от менее микрона и до десятков микрон. Химический состав кальцификата определялся методом рентгеноспектрального анализа и характеризовался атомным отношением Ca/P. Анализ плотных кальцинозных образований показал, что Ca/P для них находится в интервале от 1,72 до 1,80 (у стехиометричного апатита — 1,67). Для более рыхлых кальцификатов, а также в периферийной части плотных образований это отношение часто соответствует кальцийдефицитному гидроксиапатиту (Ca/P = 1,45–1,60). По данным инфракрасной спектроскопии в составе гидроксиапатита клапанов содержатся ионы CO_3^{2-} в количестве примерно 4–5 мас.%. Присутствие карбоната характерно для апатита человеческого организма, где ионы CO_3^{2-} замещают группы PO_4^{3-} в структуре. Отношение Ca/P = 1,70–1,80 свойственно кости взрослого человека, где увеличение карбонатной составляющей с возрастом приводит к изменениям в составе первоначально кальцийдефицитного гидроксиапатита.

По данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), агрегаты кальцификатов сердечных клапанов состоят из первичных частиц, отличающихся по размеру, морфологии и структурной упорядоченности. Основная масса гидроксиапатита клапанов состоит из нанокристаллов величиной 10–100 нм, аналогичных костному апатиту. Относительно крупные зёрна обычно состоят из разориентированных блоков с размерами от 5 нм до 20 нм. Примечательно, что плохо окристаллизованные, по данным рентгеновской дифракции, образцы в электронном микроскопе с высоким разрешением видны как блочные нанокристалы. Для гидроксиапатита природных минерализованных клапанов характерно присутствие относительно крупных пластинчатых микрокристаллов (1–5 мкм), однако они составляют незначительную часть общего объёма.

В отдельных минерализованных клапанах вблизи от гидроксиапатита наблюдаются микрокристаллы пластинчатого и призматического гидроксиапатита, часто растущие из одного центра и образующие сферические включения до 60 мкм в диаметре. Отношения Ca/P, полученные при сравнении с эталонным апатитом, находятся в интервале от 0,85 до 1 для разных измерений, что более соответствует брушиту. Рентгеновская дифракция также показала характерные для брушита рефлексы с соответствующими межплоскостными расстояниями: 7,57, 4,24, 3,05, 2,92, 2,62, 2,60. Микрокристаллы брушита не образуют ориентированных срастаний с окружающими волокнами, а рвут межволоконные связи. Как правило, микрокристаллы брушита образуются в клапанах септического генезиса или подверженных глубоким деградационным изменениям.

Изучение минерализованных створок биопротезов показало, что минеральные отложения на створках биопротезов по структуре и химическому составу существенно отличаются от кальцификата природных клапанов. Массивный кальцификат представлен в основном фосфатом кальция и небольшим количеством фосфата железа.

Соотношение Ca/P для фосфата кальция соответствует кальцийдефицитному гидроксиапатиту 1,67. Для разных биопротезов и отдельных частей одного биопротеза отношение Ca/P варьируется от 1,43 до 1,60. Фосфат железа находится по периферии кальцификата в тонком слое, примыкающем к плотному слою фибриновых волокон. Как правило, слой фибриновых волокон образуется на створках биопротезов уже в первые месяцы после операции.

По данным электронной микроскопии высокого разрешения, обнаруженный в кальцинозных образованиях фосфат железа является аморфным веществом. Гидроксиапатит во всех образцах представлен нанокристаллами игольчатой формы длиной до 200 нм и шириной около 5–10 нм с характерным контрастом — светлой центральной областью и тёмными краями. На электронно-микроскопическом снимке высокого разрешения видны характерные для гидроксиапатита межплоскостные расстояния — 0,82 нм. Нанокристаллы гидроксиапатита обнаружены как в крови больных, поражённых кальцинозом, так и в образцах донорской крови. Частицы крови более однородны по размеру нанокристаллов, чем частицы кальцификата. По размеру, морфологии и структуре они близки к костному апатиту и тонкодисперсной фракции гидроксиапатита кальцинозных образований природных клапанов сердца.

Структурная идентичность нанокристаллов гидроксиапатита крови и гидроксиапатита кальцинозных образований подтверждена данными микродифракционных измерений. На электронограммах от агрегата нанокристаллов присутствует несколько колец, рассчитанные по ним межплоскостные расстояния соответствуют гидроксиапатиту (3,4; 3,1; 2,8; 2,3; 1,8 Å). На энергетических спектрах (EDX-спектрометр)

от агрегата таких нанокристаллов фосфор и кальций находятся в соотношениях, типичных для гидроксиапатита.

В отличие от плазмы крови, в лимфе больного содержатся многочисленные частицы гидроксиапатита пластинчатой формы величиной до 2,5 мкм, аналогичные наблюдаемым в кальцификатах природных клапанов сердца. Часто они проявляют характерную для апатита гексагональную огранку. Наиболее развитыми для таких микрокристаллов являются плоскости (0001). Мелкодисперсная составляющая исследуемого образца лимфы также является фосфатом кальция. Нанокристаллы в сухих остатках лимфы по морфологии и электронно-микроскопическому контрасту на снимках от них аналогичны гидроксиапатиту, образованному на биопротезах клапанов сердца. Образцы, синтезированные при низких концентрациях ионов кальция и фосфора, содержат пластинчатые кристаллы гидроксиапатита величиной до 1 мкм с преобладанием плоскости (0001) через час после смешения реагентов. Более мелкодисперсная составляющая полученного продукта при этом находится в гелеобразном состоянии, обволакивая микрокристаллы. В последующих пробах (через 3 и 7 ч после смешения) гелеобразное состояние переходит в криптокристаллическое. Электронограммы от таких образований в последней пробе представлены диффузными кольцами, по положению их максимальной интенсивности близкие к гидроксиапатиту. Полученный в регулируемых условиях синтезированный продукт представлен минералом гидроксиапатита, что подтверждено электронной дифракцией и рентгеноспектральным микроанализом (EDX). Гидроксиапатит состоит из агрегата нанокристаллов различной морфологии и структуры. Имеются кристаллы игольчатой формы длиной до 200 нм и шириной 5–10 нм с характерным контрастом — светлая центральная линия и более тёмные края. Остальная часть состоит из частиц тонкопластинчатой формы, различных по структурной упорядоченности — от агрегата нанокристаллов и частиц размером в нескольких элементарных ячеек до кристаллов с дальним структурным упорядочением. Образцы, полученные через 1, 3 и 7 ч после смешения реагирующих компонентов, по данным просвечивающей электронной микроскопии и электроннозондового анализа (KDX), аналогичны.

Добавление в раствор магния с концентрацией 0,4 мМ в финальном растворе привело к существенному уменьшению общей массы синтезированного гидроксиапатита. В условиях, когда концентрация Mg в растворе была увеличена до 0,8 мМ, изменился не только размер частиц, но и морфология кристаллов гидроксиапатита. Полученный гидроксиапатит представлен однородными нанокристаллами, по размерам (40–70 нм) и форме близкими к костному апатиту и обладающими высокой агрегационной способностью. В суспензии также встречаются более крупные (до 0,5 мкм) огранённые микрокристаллы, уплощённые в направлении [0001]. Количество синтезированного в таких условиях гидроксиапатита находится на пределе обнаружения.

В водном растворе при концентрации натриевой соли 0,05 М отмечается уменьшение общей массы синтезированного гидроксиапатита и уменьшение размера нанокристаллов. При содержании NaCl 0,15 М с концентрацией в водном растворе ионов Ca 1,33 мМ и P 1,5 мМ фосфат кальция не образуется. В условиях, когда концентрация NaCl 0,15 М и Mg 1 мМ, в финальном водном растворе с концентрацией ионов кальция 1,33 мМ и фосфора 1,5 мМ фосфат кальция не образуется даже после выдержки раствора при комнатной температуре в течение 2 лет. Но добавление к аналогичному раствору альбумина способствовало образованию фосфата кальция. Следует отметить, что времени эксперимента в 7 ч оказалось не достаточно, чтобы получить количество фосфата кальция, необходимое для подготовки образцов и надёжной диагностики фазового состава полученного продукта. Однако осадок в растворе с аналогичными нанокристаллами через 7 дней был корректно определён электронной дифракцией и рентгеноспектральным анализом (EDX) как

гидроксиапатит. На ПЭМ-изображениях гидроксиапатит наблюдается в виде тонких пластин удлинённой формы длиной 50–150 нм. В водном растворе альбумина, где нет магния и натриевой соли, образуются нанокристаллы гидроксиапатита игольчатой морфологии, но их средняя длина (100 нм) почти вдвое меньше, чем в растворе без альбумина.

Кальцификация образующейся костной ткани состоит в отложении фосфата кальция в новообразованный матрикс. При патологической кальцификации происходит отложение фосфатов кальция в тканях различных органов. Известно, что костный апатит состоит из тонкопластинчатых нанокристаллов со средним размером $\sim 45 \times 20 \times 3$ нм. Исходя из подобия структуры, морфологии и химического состава части гидроксиапатита неорганической костной ткани с гидроксиапатитом кальцинозных образований природных сердечных клапанов, было предположено, что их минеральные элементы образуются в крови человека. Нанокристаллы гидроксиапатита, обнаруженные в твёрдых остатках крови здоровых доноров, по структуре и морфологии подобны костному апатиту.

Для объяснения физико-химической природы обнаруженных в крови нанокристаллов гидроксиапатита следует рассматривать плазму крови как флюид, в котором гидроксиапатит образуется подобно тому, как это происходит в экспериментальных условиях. Минеральные образования в природных сердечных клапанах и гидроксиапатит кости по структуре и морфологии подобны фосфатам, образованным путём преципитации из водных растворов системы $CaO–H_3PO_4–H_2O$. Данные о характере фаз, существующих в области низких концентраций компонентов этой системы, противоречивы. Однако хорошо установлено, что в условиях физиологической pH = 7,4 термодинамически наиболее стабильной фазой является гидроксиапатит.

В данной системе различия в результатах экспериментов в основном связаны со временем установления равновесия в системе. Равновесные концентрации Ca, P и pH в растворе для различных фосфатов устанавливались в течение длительного времени (от 6 месяцев до 4 лет). Концентрации Ca и P в растворе для стехиометричных гидроксиапатита и OCP: Ca — 0,14 мМ и 0,46 мМ, P — 0,04 мМ и 0,82 мМ при pH = 7,54 и 6,64 соответственно. В промежуточной области концентраций элементов между гидроксиапатитом и OCP образуются кальцийдефицитные фосфаты со структурой апатита. У живых организмов, имеющих минерализованный скелет, равновесная физиологическая pH 7,4 соответствует и, очевидно, служит поддержанию неорганической костной ткани. Характерно, что костный апатит первоначально также является кальцийдефицитным, как и апатит патологических образований. Таким образом, из экспериментальных данных и теоретических расчётов, учитывающих растворимость гидроксиапатита, следует, что плазма крови человека пересыщена по Ca и P относительно апатита при нормальных условиях. Однако зарождение и рост кристаллов гидроксиапатита в условиях организма сильно зависят от наличия ионов некоторых химических элементов и органических макромолекул, которые могут служить ингибиторами или способствовать образованию гидроксиапатита. Магний — один из наиболее важных ионов по своему влиянию на зарождение и рост кристаллов биологическою апатита. Концентрация ионов магния в плазме крови сравнима с содержанием структурообразующих элементов гидроксиапатита. Магний не только является ингибитором образования гидроксиапатита, но изменяет их размер и делает микрокристаллы более изометричными, по форме близкими к костному апатиту. Количество ионов магния в растворе обычно намного больше, чем в структуре гидроксиапатита.

Предполагается, что магний главным образом адсорбируется на кристаллической поверхности гидроксиапатита.

Ввиду относительно высокой концентрации в крови человека, влияние NaCl как замедлителя образования гидроксиапатита очевидно по причине увеличения ионного напряжения в растворе. Однако натриевая соль может полностью подавлять образование гидроксиапатита в водном растворе. Фосфаты кальция не образуются, когда концентрация Mg и NaCl в исходном растворе близка к их концентрации в плазме крови. Последовательно усложняя эксперимент неорганическими ингибиторами, содержащимися в плазме крови (Mg и NaCl), обнаружили влияние этих элементов на зарождение и морфологию нанокристаллов гидроксиапатита, образованного в водном растворе. Синтезированные в контролируемых условиях нанокристаллы гидроксиапатита, по структуре и морфологии близки к нанокристаллам, образованным в организме человека. Иглоподобные нанокристаллы гидроксиапатита, составляющие массивный кальцификат на биопротезах сердечных клапанов, и нанокристаллы гидроксиапатита, обнаруженные в лимфе больного, одинаковы по морфологии и структуре с нанокристаллами, полученными при отсутствии Mg или когда его концентрация гораздо ниже нормального содержания в крови человека. Аналогичные иглоподобные нанокристаллы также наблюдаются в экспериментах по минерализации сухожилия и образуются в водном растворе в присутствии полиакриловой кислоты. Вероятно, органическая составляющая этих экспериментов не являлась определяющей, потому что они, как следует из экспериментов, образуются при спонтанной минерализации в водных растворах и без органических веществ. Характерно, что эти эксперименты проводились без участия Mg в исходных растворах. Магний при концентрации, соответствующей нижней границе нормы в крови человека, приводит к образованию нанокристаллов, аналогичных костному апатиту.

Влиянию органических макромолекул на зарождение и рост гидроксиапатита и, в большей степени, октакальциевого фосфата посвящено много экспериментальных работ, ориентированных на выяснение механизма физиологической минерализации костной ткани и получение биосовместимых костных трансплантатов. Биосовместимость костных трансплантатов значительно улучшается, когда для создания на поверхности слоя нанокристаллов гидроксиапатита, по структуре и морфологии близких к костному апатиту, проводится их конечная обработка. Для этого используются так называемые флюиды организма (body fluid) — водные растворы, по химическому составу неорганических компонентов близкие к плазме крови. Результаты этих работ также свидетельствуют, что кровь является природной жидкостью, где могут образоваться нанокристаллы гидроксиапатита, близкие по своим свойствам костному апатиту.

В экспериментальных работах, связанных с кальций-фосфатной минерализацией, альбумин рассматривается как белковая макромолекула, способствующая образованию предшественника гидроксиапатита — октакальциевого фосфата на коллагене или гидроксиапатите. Макромолекулы альбумина могут действовать как специфический ингибитор роста, когда они в растворе, и как нуклеационная матрица, когда они адсорбировались на твёрдом субстрате. В существующих моделях физиологической минерализации костной ткани и при образовании патологических кальцификатов учитывается лишь гетерогенное зарождение на органических матрицах (коллаген, эластин фосфолипидные клеточные мембраны и др.). Однако нанокристаллы, аналогичные костному апатиту и апатиту патологических кальцинозных образований сердечных клапанов и их биопротезов, можно получить и в водных растворах, по механизму спонтанной минерализации. Наличие нанокристаллов гидроксиапатита в крови здоровых доноров свидетельствует об их физиологической природе. В экспериментах по моделированию ионного состава крови с участием альбумина нанокристаллы гидроксиапатита получены при спонтанной преципитации из водного раствора. Очевидно, макромолекулы альбумина понижают энергию зарожде-

ния кристаллического гидроксиапатита в водных растворах. Кроме того, адсорбция альбумина на кристаллическом гидроксиапатите будет препятствовать агрегации нанокристаллов и увеличению их размеров.

Из экспериментальных результатов также следует, что образование нанокристаллов гидроксиапатита в крови возможно только при участии альбумина и, вероятно, других белков и ферментов, которые могут ускорять или ингибировать образование гидроксиапатита. Учитывая, что матрикс растущей кости потребляет альбумин из крови, можно предположить особую роль альбумина в процессе кальцификации мягких тканей.

Спонтанная преципитация гидроксиапатита в крови способна произвести большую массу нанокристаллов гидроксиапатита, которые могут участвовать и в патологической минерализации клапанов сердца и аорты.

Проникновению нанокристаллов гидроксиапатита, образованных в крови, к волокнам коллагена с последующим осаждением может способствовать нарушение эндотелия и деградация тканей, что отмечается во многих исследованиях по минерализации природных клапанов сердца и их биопротезов. Одним из факторов, влияющих на формирование массивных кальцинозных образований на биопротезах сердечных клапанов, может служить пониженное содержание магния в крови. Такое предположение следует из аналогии структуры и морфологии нанокристаллов гидроксиапатита, составляющих кальцификат на биопротезах, и нанокристаллов, синтезированных в регулируемых условиях с недостатком магния, относительно его содержания в крови человека. Преобразование гидроксиапатита до брушита в ткани клапана на поздней стадии минерализации может происходить при понижении pH. Понижение pH происходит в результате глубоких деградационных изменений в ткани клапана, связанных с функциональными нарушениями при кальцификации и/или в результате септических процессов. Нанокристаллы гидроксиапатита, обнаруженные в плазме крови здоровых доноров, имеют физиологическую природу и, вероятно, участвуют в минерализации костной ткани. Особая роль в этом процессе принадлежит основному белку крови — альбумину. Наличие нанокристаллов гидроксиапатита в крови, а также синтез гидроксиапатита в условиях, моделирующих ионный состав элементов крови, свидетельствуют о прямом (без промежуточных фаз) образовании гидроксиапатита. Более кислые фосфаты кальция образуются после минерализации гидроксиапатита в результате вторичных процессов, приводящих к понижению pH в жидкостях тканей. Участие гидроксиапатита, образованного в крови, в патологической минерализации мягких тканей органов кровообращения возможно при потере организмом защитных функций (повреждение эндотелия, деградация тканей и др.).

17.6. Нанокластеры кремния

Нанотехнологии позволиляют получать нанокластеры кремнезёма в виде микроколлоидных частиц, влияющих на структуру воды, а именно на образование структурированной воды, близкой к той воде, которая находится в клетках организма. Полагают, что действие таких наноклакстеров заключается в упорядочении структуры воды и потенцировании влияния классических антиоксидантов. Эти кремневые шарики бакиболы (silica buckyballs) имеют сильный отрицательным заряд. Один из них — микрогидрин является сильным антиоксидантом, превосходящий действие эталонного антиоксиданта α-токоферола в 100 раз.

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) обычной воды — +150 мВ, а при взаимодействии с нанокластерами кремния он смещается в сторону отрицательных значений до −50 мВ. Последняя величина соответствует ОВП межклеточных жидкостей организма. При этом клеткам организма не приходится тратить

энергию на выравнивание ОВП и энергия расходуется на обеспечение внутриклеточного обмена. Кроме того, восстанавливается жидкокристаллическая структура воды, как это имеет место в клетках организма (при замерзании такой воды она имеет идеальную кристаллическую структуру), что свидетельствует об упорядочении диполей молекул воды.

Как известно, структурирование воды влияет на третичную структуру макромолекул и на скорость ферментативных реакций. В частности известно, что гидролиз пенициллина или дегидратация 5,6-дигидро-6-гидроксидиоксиуридина значительно ускоряется, когда эти процессы протекают «во льду». Если активные центры ферментов локализованы в структурированной воде, то можно получить объяснение большей скорости ферментативных реакций. На границе раздела липид/вода в биологических мембранах за счёт неподелённых пар электронов атомов азота или кислорода, которые формируют полярные головки, образуются водородные связи с молекулами воды.

Гидрофобные участки молекул ориентируются и проникают в липидный слой. Биодоступность и биоактивность структурированной воды значительно выше. Биологически активные вещества в такой воде действуют более эффективно (Р. Д. Сейфулла, 1976).

Нанокластеры, благодаря своим маленьким размерам, легко проникают через клеточные мембраны и несут отрицательный заряд. Полагают, что нанокластеры кремния являются эффективной системой доставки питательных веществ в клетку и вывода токсинов из клетки. При этом они обладают значительным антиоксидантным действием.

Как видно из данных табл. 17.3 [31] микрогидрин на 10-й и 21-й день исследования оказывает достоверное антиоксидантное действие и стабилизацию концентрации АТФ, лактата и мочевины, в то время как сверхвысокая физическая нагрузка вызывает увеличение концентрации свободных радикалов (по результатам измерения хемилюминесценции) в крови спортсменов.

Таблица 17.3

Влияние микрогидрина (2 капсулы в день) на процесс хемилюминесценции крови спортсменов высокой квалификации, в % к контролю ($n = 20$)

Группы	Исходное состояние	На 10-й день	На 21-й день	Через 5 дней после приёма
Контроль (placebo)	$109{,}4 \pm 8{,}3$	$100{,}4 \pm 9{,}7$	$128{,}1 \pm 8{,}2^*$ $p < 0{,}05$	$100{,}1 \pm 7{,}2$
Эксперимент (Микрогидрин)	$99{,}2 \pm 10{,}5$	$54{,}3 \pm 6{,}8^*$ $p < 0{,}05$	$69{,}1 \pm 6{,}4^*$ $p < 0{,}05$	$99{,}3 \pm 9{,}2$

* Каждая капсула микрогидрина (250 мг) содержит тысячи нанокластеров кремния.

17.7. Безопасность наночастиц

Очень важная проблема наноформакологии — безопасность наночастиц, связанная с их растворимостью. Значительное количество эффективных субстанций так и не стали лекарственными препаратами из-за плохой растворимости. Низкая токсичность или хорошая переносимость — одно из определяющих свойств лекарственного средства. Кроме токсичности, присущей веществам, входящим в состав наночастицы, токсичность может быть связана с размером, формой и свойствами поверхности наночастицы.

Важно отметить, что для проявления токсичности наночастиц важным фактором оказывается путь проникновения в организм: через дыхательные пути, через ЖКТ, через кожу. Наибольшую опасность представляют наночастицы, проникающие в организм при вдыхании. Следует вспомнить, что с наночастицами люди сталкивались задолго до появления нанотехнологий: дым, в том числе и табачный, смог. Силикоз, возникающий вследствие вдыхания угольной пыли, рак лёгких при контакте с асбестом — известные факты.

В общем, ничего необычного пока не найдено. Токсичность наночастиц, способных растворяться, определяется токсичностью растворяемого вещества. В этом отношении следует обратить внимание на квантовые точки, особенно если речь идёт о соединениях кадмия.

Биодеградируемость — ещё одно свойство наночастиц (так же как и полимеров), которое определяет степень их токсичности. Чтобы наночастицы не накапливались в организме, они должны распадаться на фрагменты, которые могли бы выводиться почками, т. е. превращаться в полярные вещества с массой менее 25 кДа. С этой точки зрения, настороженность вызывают неорганические материалы — квантовые точки (которые предполагается использовать для визуализации патогенных участков), магнитные наночастицы и частицы из оксидов кремния и титана.

Вообще-то нет принципиальных ограничений на выведение через почки наночастиц, размером не превышающих размер белка 25 кДа (если эта наночастица не «застрянет» в каком-либо компартменте, к которому данный вид наночастиц испытывает особое сродство). Вспомним, что по крайней мере некоторые наночастицы хорошо проходят через ГЭБ (и могут там накапливаться). Также стоит вспомнить, что естественными мишенями для наночастиц являются макрофаги. После поглощения макрофагом плохо деградируемые наночастицы могут накапливаться в этих клетках, вызывая их деструкцию.

К нанолекарствам применимы те же требования безопасности, что и ко всем другим. Поэтому есть все основания считать, что никакие лекарственные или диагностические препараты, полученные на основе нанотехнологий, не попадут в больницы и аптеки без стандартной процедуры проверки безопасности.

17.8. Заключение

Последние двадцать лет характеризуются всё возрастающим интересом к веществам, состоящим из частиц нанометрового размера. Стало популярным представление о том, что в ближайшем будущем будет создана новая медицина, основанная на использовании наночастиц в качестве лекарственных средств. Вместе с тем стало ясно, что использованию таких лекарственных средств должны предшествовать фундаментальные исследования поведения наночастиц в организме человека, в результате которых должны быть выявлены оптимальные требования к лекарственным средствам и технологии их получения. Стало ясно, что необходима коллективная работа физиков, химиков, биологов, медиков и технологов по созданию специальной отрасли научного поиска, которую можно назвать нанотехнологией для медицины. Нанотехнология для медицины будет «наукоёмкой» и высокозатратной.

Вместе с тем, можно предположить, что ассортимент нанолекарств со временем будет расширяться, и если окажется, что наночастицам многих веществ удастся «привить» способность проникать внутрь патологических клеток и влиять на их функционирование, то будет создана индустрия, производящая тысячи нанодисперсных лекарственных средств. Вследствие такой перспективы становится актуальной разработка менее затратных нанотехнологий «гибких» производств, в которых с помощью одних и тех же систем аппаратов можно получать множество лекарственных

форм, перестраивая режимы работы аппаратов. Такие нанотехнологии целесообразно разрабатывать, ориентируясь на закономерности изменения свойств наночастиц в процессе производства и при дальнейшем использовании нанодисперсного вещества, т. е. на закономерности его физико-химической эволюции.

При известных закономерностях эволюции имеется возможность выбрать конструкции и режимы работы аппаратов, при которых, прерывая процесс образования данного лекарственного вещества на разных стадиях его эволюции, можно получить лекарства разного назначения. Появляется также возможность определить, какие изменения в режиме работы аппаратов необходимо сделать, чтобы на тех же аппаратах получить другие нанодисперсные вещества. Кроме того, становится понятным, какие свойства должны иметь наночастицы производимых продуктов, чтобы эволюция их свойств после введения в организм больного способствовала максимальному лечебному эффекту.

Проведённые в последние годы исследования по созданию и изучению новых аллотропных форм углерода (нанотрубочки, фуллерены), липидных везикул, наночастиц металлов и различных полимеров показывают, что нанотехнологии открывают новые возможности в получении таргетных препаратов, наночастиц с принципиально новыми, ещё не изученными свойствами и при проведении диагностики (наночастицы оксида железа как органотропные магнитно-резонансные контрастные средства). Наносомальные многофункциональные платформы должны обеспечить сочетание диагностики и лечения.

В фармакологии актуальными являются разработки, которые связаны с нанотехнологиями придания ряду лекарственных средств лучшей водорастворимости. Например, получены водорастворимые фракции β-каротина, которые в 20 раз лучше усваиваются организмом, чем его жирорастворимая форма. Уже активно используются в стоматологии наночастицы гидроксиаппатита для ускорения заживления костных переломов.

Инновационные медицинские технологии, базирующиеся на нанотехнологиях и клеточных технологиях, позволяют создать устройства для регистрации межмолекулярных взаимодействий на основе оптических и нанопроводных биосенсоров для диагностики вирусных и раковых заболеваний; для высокопроизводительного чтения геномов на основе нанопроводных детекторов. С помощью подобных исследований разрабатываются эффективные методы функциональной клинической геномики и протеомики, позволяющие проводить диагностику наследственных и мультифакториальных заболеваний человека.

Современные высокотехнологичные методы регуляции репродукции и лечения сердечно-сосудистых заболеваний включают использование лучевой диагностики (компьютерной томографии, магнитно-резонансной и ультразвуковой визуализации с контрастным усилением), молекулярной визуализации и радиотерапии короткоживущими радиоизотопами. Современные врачи и хирурги должны владеть технологиями малоинвазивных кардиологических, урологических, гинекологических и сосудистых вмешательств, коронарного стентирования, использования стволовых клеток у больных с ишемическими поражениями, применения лазерных и радиочастотных технологий для малоинвазивной и высокоточной хирургии и генной терапии с помощью наночастиц с таргетными и векторными свойствами.

Нанофармакология, как часть наномедицины, в ближайшие десятилетия благодаря созданию наночастиц с диагностическими и лекарственными средствами, а также наличию адресных молекул, определяющих направленный транспорт, будет во многом определять прогресс диагностики и лечения многих социально значимых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 17

1. *Yang X.* Nano- and Microparticle-based Imaging of Cardiovascular Interventions: Overview // Radiology. 2007. V. 243. P. 340–347.
2. *Gholam A., Peyman G.A.* Micro- and nanoparticulates // Advanced Drug Delivery Reviews. 2005. V. 57. P. 2047–2052.
3. Биосовместимые наноструктурные материалы и покрытия медицинского назначения // Сб. научн. трудов. — Белгород, 2006. — 408 с.
4. *Ryan J. et al.* Fullerenes inhibit IgE-induced anaphylaxis in vivo // J. Immunol. 2007. V. 179. P. 665–672.
5. *Bellin M.-F., Van Der Molen A.J.* Extracellular gadolinium-based contrast media: An overview // Eur. J. Radiol. 2008.V. 66. P. 160–167.
6. *Abraham J.L., Thakral C., Skov L. et al.* Dermal inorganic gadolinium concentrations: evidence for in vivo transmetallation and long-term persistence in nephrogenic systemic fibrosis // Br. J. Dermatol. 2008. V. 158. P. 273–280.
7. *Broome D.R., Girguis M.S., Baron P.W. et al.* Gadodiamide-associated nephrogenic systemic fibrosis: why radiologists should be concerned // Am. J. Roentgenol. 2007. V. 188. P. 586–592.
8. *Sieber M.A., Pietsch H., Walter J. et al.* Preclinical Study to Investigate the Development of Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Possible Role for Gadolinium-based Contrast Media // Invest. Radiol. 2008. V. 43. P. 65–75.
9. *Горбатов С.А., Воронин И.В., Науменко В.Ю.* Влияние электромагнитного излучения бытовых приборов на организм человека // Медицинская физика. 2007. № 1(33). С. 63–68.
10. *Воронин И.В., Горбатов С.А., Науменко В.Ю.* Взаимодействие наночастиц, находящихся в полимерной матрице, с электромагнитным излучением сантиметрового диапазона // Биомедицинская радиоэлектроника. 2008. № 1–2. С. 80–86.
11. *Стрелков Н.С., Коныгин Г.Н., Поздеев В.В., Максимов П.Н. и др.* Биоусвояемая форма кальция глюконата // Нанотехника. 2007. № 2. С. 69–72.
12. *Pankhurst Q.A., Connoly J., Jones S., Dobson J.* Application of magnetic nanoparticles in biomedicine // J. Phys. D: Appl. Phys. 2003. V. 36. P. R167–R181.
13. *Berry C.C., Curtis A.S.G.* Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine // J. Phys.D: Appl.Phys. 2003. V. 36. P. R198–R206.
14. *Bruckl H., Pankhorst gentlemen Schotter M., Kamp P., Becher A.* Magnetic particles as markers and carriers of biomolecules // IEEE Proc. Nanobiotechnol. 2005. V. 152, № 1. P. 41–46.
15. *Matsuoka F., Shinkai M., Honda H., Kubo T., Sugita T., Kobayashi T.* Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma // Bio. Magnetic. Res. Technol. 2004. V. 2, № 3 (published online).
16. *Gould P.* Nanoparticles probe biosystems // Materials Today. 2004. V. 7, № 2. P. 36–46.
17. *Wilson M.W., Kerlan R.K., Fidelman N.A., Wenook A.P., La Berge J.M., Coda J., Gordon R.L.* Hepatocellular carcinoma: regional therapy with magnetic targered carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/conventional angiography suite — initial experience with four patients // Radiology. 2004. V. 230. P. 287–293.
18. *Suzuki M., Shinkai M., Honda H., Hobayashi T.* Anticancer effect of immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes // Melanoma Res. 2003. V. 13, № 2. P. 129–135.
19. *Nobuto H., Sugita T., Kubo T., Shimose S., Yasunaga Y., Murakami T., Ochi M.* Evatuation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and dip electromagnet // Int. J. Cancer. 2004. V. 109, № 4. P. 627–635.

20. *Morawski F.M., Winter P.M., Fuhrhop X.Yu.R. W., Scott M.J., Hockett F., Robertson J.D., Gaffney P.J., Lanza G.M., Wickline S.A.* Quantitative «magnetic resonance immunohistochemistry» with ligand-target nanoparticles // Magn. Resonance Med. 2004. V. 52, № 6. P. 1255–1262.
21. *Winter P.W., Caruther S.D., Kassner A., Harris T.D., Chinen L.K., Allen J.S., Lacy E.K., Zhang H., Robertson J.D., Wickline S.A., Lanca G.M.* Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumor using a novel alphaV-beta3 targeted nanoparticle and 1,5 tesla magnetic resonance imaging // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 5838–5843.
22. *LeGeros R.Z.* Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification // Z. Cardiol. 2001. V. 90. Suppl. 3. P. 116–124.
23. *Tomasic B.B.* Physicochemical principles of cardiovascular calcification // Z. Cardiol. 2001. V. 90. Suppl. 3. P. 168-180.
24. *Yamaguchi I., Kogure O., Sakane M.* Microstructure analusis of calcium phosphate formed tendon // J. Mater. Science: Mal. in Med. 2003. V. 14. P. 883–889.
25. *Allen T.M., Martin F.J.* Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines // Semin. Oncol. 2004. V. 6. Suppl. 13. P. 5–15.
26. *Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V., Ramge P., Cychutek K., Koch-Brandt C., Alyautdin R.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier // J. Drug Target. 2002. V. 10. P. 317–325.
27. *Garnett M.C., Kallinteri P.* Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles // Occupational Medicine. 2006. V. 56. P. 307–311.
28. *Hardman R.* A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors // Environmental Health Perspectives. 2006. V. 114. P. 165–172.
29. *Arbab A.S., Wilson L.B., Ashari P., Jordan E.K., Lewis B.K., Frank J.A.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging // NMR Biomed. 2005. V. 18, № 6. P. 383–389.
30. *Torchilin V.P.* Multifunctional nanocarriers // Adv. Drug Deliv. Rev. 2006. V. 58, № 14. P. 1532–1555.
31. *Сейфулла Р.Д., Тимофеев А.Б., Орджоникидзе З.Г. и др.* Проблемы использования нанотехнологии в фармакологии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т. 71, № 1. С. 61–69.
32. *Mulder W.J., Griffioerr A.W., Strijers G.J. et al.* Magnetic and fluorescent nanoparticles for multimodality imaging // Nanomedicine. 2007. V. 2, № 3. P. 307–324.