Посвящается 60-летию основания Отделения физиологии РАН

Российская академия наук
Отделение физиологических наук
Секция клинической физиологии

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

Москва
2023

УДК 616-092
ББК 52.52
К49

Отв. ред. акад. Ю.В. Наточин, акад. М.Д. Алиев

К49 Клиническая физиология / Российская академия наук, Отделение физиологических наук, Секция клинической физиологии ; ответственный редактор академик Ю. В. Наточин, академик М. Д. Алиев. – Москва : РАН, 2023. – 476 с. : ил, цв. ил.

Редколлегия:
М.Д. Алиев, Ю.В. Наточин, В.А. Ткачук, А.А. Феденко, Н.Г. Шеремета

Клиническая физиология как наука анализирует проблемы, касающиеся физиологических механизмов функции у человека и возникновения дисфункций при патологических процессах, появления симптомов. Поскольку органы полифункциональны, необходимо установить локус повреждения изучаемой функции, роль в этом отдельных органов и систем регуляции, рассмотреть способы лечения, включая фармакологические средства и радикальное хирургическое вмешательство. В книге рассматриваются фундаментальные и прикладные проблемы клинической физиологии функциональных систем организма человека.

УДК 616-092
ББК 52.52
К49

ISBN 978-5-907366-95-4

© М.Д. Алиев, Ю.В. Наточин, В.А. Ткачук, А.А. Феденко, Н.Г. Шеремета, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 5

Глава 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ КАК НАУКА 6
Ю.В. Наточин

Глава 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ДЫХАНИЯ. 21
А.В. Аверьянов

Глава 3. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СЕРДЦА И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОМ КОНТИНУУМЕ. 42
Ю.Н. Беленков, М.В. Кожевникова, Е.О. Коробкова

Глава 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ПОЧКИ 69
Ю.В. Наточин

Глава 5. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ . . 94
Ф.И. Атауллаханов, А.Н. Баландина, Л.Д. Колева, Е.И. Синауридзе, М.А. Пантелеев

Глава 6. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ 221
М.Д. Алиев, С.П. Миронов, Э.Р. Мусаев, А.А. Феденко

Глава 7. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШИХ ФУНКЦИЙ МОЗГА, ИЛИ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ПАМЯТИ 266
П.М. Балабан

Глава 8. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ 283
М.А. Островский

Глава 9. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ 308

КОСМИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА: ОТ ФИЗИОЛОГИИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ К СОХРАНЕНИЮ ЗДОРОВЬЯ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ . . 308
О.И. Орлов, Л.Б. Буравкова

ВООРУЖЕННЫЙ КОНФЛИКТ КАК ЭКСТРЕМАЛЬНАЯ СИТУАЦИЯ 324
Ю.А. Бубеев

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ С ПОЗИЦИЙ СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА 334

А.В. Алехнович

Глава 10. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ . . 353

С.Б. Середенин, Ю.В. Вахитова

Глава 11. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ 370

В.А. Ткачук

Глава 12. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ 380

ДИФФУЗНАЯ НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННАЯ СИСТЕМА: СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ РОЛЬ В КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИЯ 380

М.А. Пальцев, И.М. Кветной

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ 398

М.А. Пальцев, И.М. Кветной

Глава 13. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 407

В.А.Черешнев, Б.Г. Юшков

Глава 14. МИКРОБИОМ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. . . 418

В.К. Ильин, С.В. Черкасов

Глава 15. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ПРИЗНАКИ И ПРИРОДА РАКА 453

А.А. Богданов, Н.М. Волков, В.А. Чубенко, В.В. Егоренков, Ф.В. Моисеенко, В.М.Моисеенко

Предисловие

Предлагаемая читателю книга дает целостное представление, касающееся клинической физиологии состояния основных функций организма человека, когда они нарушены в результате патологического процесса. Это направление исследований находится в стадии становления, редколлегия сознательно не устанавливала границ единого подхода, чтобы каждый автор свободно изложил свое видение современных вариантов, подходов фундаментальной науки в решении многих проблем клинической физиологии. В этой работе приняли участие ведущие специалисты в областях, тесно связанных с изучением физиологических функций и их регуляции, таких как патология, фармакология. Книга рождает много дискуссионных вопросов общей и частной клинической физиологии, что станет основой постановки новых задач и последующих решений, обеспечивая интеграцию классической физиологии с актуальными, рожденными новейшими методами направлений исследований сопредельных дисциплин, тем самым обогатит клиническую медицину эффективными способами диагностики и лечения различных сложных форм патологии.

М.Д. Алиев, Ю.В. Наточин, В.А. Ткачук, А.А. Феденко, Н.Г. Шеремета

Глава 1. Клиническая физиология как наука

Ю.В. Наточин

Клиническая физиология – одно из важнейших направлений физиологии, прежде всего физиологии человека. Эта наука не означает изучения физиологических функций у человека при его обследовании в клинических условиях, суть этого раздела физиологии состоит в разработке фундаментальных проблем науки, касающихся возможности сведения воедино данных молекулярной, системной физиологии, результатов применения нагрузочных проб для оценки резервных возможностей физиологических функций у человека и последующей постановки диагноза на основе дифференциальной диагностики, применения инструментальных методов обследования в клинике. Это обеспечит обоснованное назначение патогенетической терапии, исходя из понимания природы дисфункций. Проблемы клинической физиологии должны быть проанализированы как последовательность действий врача от знакомства с пациентом, сбора анамнеза до назначения аргументированного лечения. В литературе рассмотрены различные аспекты клинической физиологии [3, 4, 10, 12, 44]. Подход, который предложен нами читателю о клинической физиологии, принципиально иной, он основан на концепции полифункциональности органов и представлении о распределенной функции [18].

При осмотре пациента в клинике, при заболевании или диспансеризации первый вопрос связан с выяснением наличия отклонений от физиологической нормы, иначе говоря, есть ли жалобы, нарушены ли функции, что находит выражение в том или ином симптоме, отклонении функции от нормы, т. е. появления дисфункций. Число основных функций в организме человека ограничено, они касаются дыхания, пищеварения, кровообращения и т. п. (таблица 1).

Таблица 1. Физиологические функции «титульных» органов

Физиологические функции	**Титульный орган**
Дыхание	Легкие
Пищеварение	Желудочно-кишечный тракт
Кровообращение	Сердечно-сосудистая система
Выделение	Почки
Движение	Мышцы
Мышление	Мозг
Размножение	Половые органы
Сенсорика	Органы чувств
Секреция гормонов	Эндокринные железы

В распространенной литературе существует представление о главной функции органа, что имеет ключевое значение в жизни организма, оно вошло в учебники, руководства [8, 11, 39, 48]. Речь идет о функции, названной нами «титульной» в деятельности органа (таблица 1). Оказалось, что это поверхностный подход к проблеме, поскольку в выполнении каждой функции могут участвовать разные органы, которые полифункциональны, возникающие дисфункции находят отражение в симптомах, их сочетаниях (синдромах) [41]. Возникает необходимость проведения физиологического анализа причин нарушения каждой из функций, выяснения уровня нарушений деятельности вовлеченных органов и на этой основе разработки патогенетической терапии. Представление о полифункциональности органов диктует необходимость следующего шага – разработки проблемы распределенных функций, в выполнении каждой из которых участвуют разные органы. Для примера приведены данные о деятельности почек и легких (таблица 2).

Таблица 2. Функции почек и легких

Почки	**Легкие, бронхи**
Осморегулирующая	Терморегуляция
Экскреторная (мочевина и др.)	Экскреторная (удаление CO_2)
Инкреторная $(OH)_2$ витамин D_3 и др.	Инкреторная (секреция гормонов)
Регуляция pH крови	Кислотно-основное состояние
Участие в иммунном статусе	Антимикробная защита, секреция иммуноглобулина
Метаболическая	Дыхание (O_2), участие в вокализации
Регуляция объема крови	Депонирование крови
Ионорегулирующая	Регуляция свертывания крови

Отсюда возникает необходимость следующего шага: установить, где локализованы компоненты данной функции и как в организме осуществляется интеграция каждой функции, как обеспечить диагностику дефекта и помочь восстановлению функции. Предлагаемая функциональная организация систем, обеспечивающих гомеостаз, требует решения проблемы координации деятельности органов, участвующих в осуществлении каждой функции в отдельности и всех вместе как ансамбль в целостном организме. Где анализируется информация от афферентной системы каждого параметра, где локализован центр управления и каким образом принимается решение об участии данного органа из нескольких органов, каким образом осуществляется решение вопроса о том, какое физиологически активное вещество и в каком количестве должно быть секретировано. Речь идет о гормонах, медиаторах, аутакоидах с однотипным эффектом на эффекторный орган, например обеспечивающих регуляцию натрийуретического эффекта [19] уменьшающих реабсорбцию ионов натрия и тем самым повышающих его экскрецию почкой.

Примером распределенных функций может быть разнообразие органов и тканей, участвующих в иммунном ответе (таблица 3). Выше речь шла о том,

что комплекс органов выполняет одну функцию организма и задача клинициста состоит в определении локуса, нарушения функции одного или нескольких органов при данной форме патологии у обследуемого пациента. Возможен и иной вариант, при котором «титульный» орган анатомически широко представлен в разных локусах у человека, что наблюдается в отношении иммунной системы (таблица 3). Задача клинической физиологии состоит в разработке алгоритма поиска повреждения при рассмотрении всех элементов от органа до молекулярного механизма эффекта [26, 29, 33, 35, 49].

Клиническая физиология использует широкий круг подходов, методов классической физиологии, включая методы электрофизиологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики, биоинформатики. Понимание функциональной организации каждого органа дает возможность не только выявить изменения мембранных систем (ионных и водных каналов, транспортеров), вторичных мессенджеров, но и установить роль, участие регуляторных молекул в выполнении каждой из функций. Иными словами, физиология служит фундаментом фармакотерапии как важнейшего компонента клинической физиологии. Физиологию можно рассматривать как одну из основных наук естествознания, а клиническую физиологию – как важный компонент трансляционной медицины, один из путей использования данных фундаментальной науки (клиническая физиология) в прикладной науке, которой в данном случае является медицина.

Таблица 3. Органы и ткани иммунной системы

Иммунная система крови
Кроветворный костный мозг
Лимфатические узлы
Лимфоидная система кожи
Лимфоидная система мозга (субпопуляции лимфоцитов, иммуноцитов)
Лимфоидная ткань бронхов (бронхиол), слизистой оболочки дыхательной системы
Лимфоидная ткань желудочно-кишечного тракта (миндалины, аденоиды, аппендикс и др.)
Лимфоидная ткань слизистых оболочек мочеполовых органов (влагалище, мочевой пузырь, дендритные клетки почки)
Селезенка
Субпопуляции лимфоцитов печени
Тимус

Возможно критическое отношение к термину – клиническая физиология, почему речь идет о ней, а не о разрабатываемой в нашей стране патологической физиологии. Эпитет «нашей» не оговорка, в ряде стран не используют этот термин при характеристике данного направления исследований. Острая дискуссия о путях развития патологической физиологии была в 30-е годы, и акад. А.Д. Сперанский возражал против использования термина «патологическая физиология». Полвека спустя, Саркисов и соавторы писали, что общая патология представляет опыт всех отраслей медицины, оцененный с широких

биологических позиций [27]. Подход, предлагаемый в этой главе, включает рассмотрение широкого круга вопросов в рамках клинической физиологии, он дает возможность рассмотреть ключевые изменения функций от нормы к дисфункции и ее медикаментозной коррекции с использованием методов патологии как науки, исходя из принципов современного естествознания [24].

Физиология как наука была представлена в Академии наук в России с первых лет ее существования в 18 веке, многие выдающиеся клиницисты были избраны ее членами. Базовое высшее образование у большинства физиологов медицинские университеты или медицинские факультеты. Это обусловило их интерес к фундаментальной науке и стремление использовать достижения смежных наук во благо медицины. Наиболее близка к этому направлению физиология, и выдающиеся физиологи внесли огромный вклад в разработку проблем клинической физиологии. Академик Л.А. Орбели (фото 1) был одним из основоположников эволюционной физиологии. В начале XX в. разработка проблем этой науки была основана на сопоставлении данных филогенетических, сравнительно-физиологических исследований. Л.А. Орбели предложил еще два метода – клинико-физиологические исследования, касаясь деградации функций в патологии, и данные, получаемые при действии на организм экстремальных факторов внешней среды [22]. Это направление близко клинической физиологии, оно позволяет установить закономерности появления дисфункций, что важно для выявления организации физиологической функции и находит применение при решении проблем лечения, реабилитации.

Фото 1. Академик Леон Абгарович Орбели (1882–1958) Фото авт.

Неоценим вклад в разработку проблем клинической физиологии и изучения влияния на организм экстремальных условий. Особенно значителен вклад в эту область науки акад. О.Г. Газенко (фото 2). Он был в конце 40-х гг. адъюнктом у Л.А. Орбели, участвовал в разработке базовых принципов решения проблем авиационной и космической медицины, использования данных авиакосмической физиологии в клинической физиологии, а затем и клинической медицине. Эти направления исследований успешно развили врачи-космонавты Б.Б. Егоров, Г.М. Моруков, О.Ю. Атьков.

Фото 2. Академик Олег Георгиевич Газенко (1918–2007) Фото авт.

Члены Отделения физиологии АН СССР широко использовали достижения физиологии в клинической практике. Акад. Е.И. Чазов (фото 3) был избран членом АН СССР по Отделению физиологии, и в созданном им Кардиологическом научном центре плодотворно развивались фундаментальные проблемы физиологии и часто немедленно применялись во благо клинической медицины.

Фото 3. Академик Евгений Иванович Чазов (1929–2021) Фото авт.

Клиническая физиология обеспечивает расшифровку физиологических процессов в организме как едином образовании, она включает реализацию

проблемы целостности [17]. Современные физиологические исследования отражают библейскую максиму: было «время разбрасывать камни» (молекулярная физиология конца XX в.), настала эпоха «собирать камни» – выяснить, как каждый молекулярный механизм действует, будучи включенным в деятельность организма как целого [48].

В этой книге о клинической физиологии разных систем организма каждый из авторов отражает свой подход к пониманию проблем клинической физиологии, что обеспечивает построение контуров ее нового многогранного образа. После описания принципов общей клинической физиологии последовательно рассматриваются ключевые разделы частной клинической физиологии с учетом особенностей номенклатуры медицинских наук, изучающих разные функциональные системы организма отдельными науками – такими как кардиология, гематология [37] пульмонология [9], нефрология [36], гастроэнтерология [34], эндокринология [13], общие вопросы патологии, онкологии, проблемы регенерации [32] и др.

Представляет ли интерес физиология как фундаментальная дисциплина для клиницистов? Вопрос не риторический, он является сутью развития клинической физиологии, в этих двух словах содержится вопрос, на который необходим непротиворечивый ответ. Приведем известные примеры мнений, поступков великих клиницистов. Выдающийся терапевт С.П. Боткин в своей клинике создал физиологическую лабораторию и пригласил И.П. Павлова ее возглавить [7]. Великий хирург Н.И. Пирогов учился на медицинском факультете МГУ и был рекомендован для подготовки к профессорскому званию комиссией Академии наук. Это было в 1828 г., когда при Дерптском университете по замыслу императора был создан профессорский институт для дополнительного обучения профессоров из «пригодных россиян». В него зачисляли после экзамена и отбора в Санкт-Петербургской Академии наук. Н.И. Пирогов в «Дневнике старого врача» вспоминает это событие и рассказывает, как Е.О. Мухин говорил ему, что надо выбрать какую-нибудь из медицинских наук. «Я, долго не думая, да и брякнул так: «Физиологиею»» [25]. Так в подлиннике Пирогова.

Клиника дает исключительный импульс для развития физиологии. Расшифровка физиологических механизмов сложных клинических состояний позволяет найти новые подходы в диагностике и лечении, она открывает новые грани реализации физиологических функций. Если в арсенале физиолога и клинициста нет объяснения, понимания природы изучаемого состояния, значит, открывается новое поле для поиска. Это касается физиологии экстремальных состояний, разных вариантов клинической медицины, клиники орфанных болезней и повседневно встречающихся социально значимых болезней, механизмов постоянного обновления органов и тканей [32].

Клиническая физиология как ключ понимания распределенных функций

Каждый орган выполняют комплекс функций, каждая функция зависит от согласованных эффектов нескольких органов. Каждый орган может осуществлять несколько различных функций (таблица 2), физиологически их регуляция тоже зависит от участия нескольких систем, включая нервную

и эндокринную у человека. Это отражается на природе дисфункции, выборе способов не только диагностики, но и последующего лечения. Так, стабилизация pH плазмы крови зависит от деятельности легких, желудочно-кишечного тракта, почек.

При рассмотрении функций разных органов возникает проблема координации их деятельности для выполнения одной и той же функции организма. Так, в регуляции кислотно-основного состояния организма участвуют несколько органов, и проблема клинической физиологии состоит в том, чтобы выявить нарушения: какого органа или центра координации данной функции изменены и вызывают сдвиги pH крови в данном организме. Важнейшая задача заключается в том, чтобы выяснить молекулярное устройство стандарта, на который ориентируется центр регуляции. Данная проблема (стандарта) касается разных параметров гомеостаза, механизм ее осуществления не был ранее даже поставлен. Возможно, при патологии происходят сдвиги не регуляции данной функции, а значения стандарта, на который она настроена. Следует подчеркнуть, что основные физико-химические параметры жидкостей внутренней среды удерживаются постоянными в течение всей жизни, практически без перемен (таблица 4).

Выдающиеся представители клинической физиологии и экспериментальной медицины избирались в Академию наук. В их числе были Н.И. Пирогов, А.Н. Бакулев, Б.В. Петровский, Е.И. Чазов и др. Успехи советской медицины в Великой Отечественной войне явились важным аргументом для организации в 1944 г. Академии медицинских наук СССР. Но, несмотря на это, престиж АН СССР был столь значителен, что в XX в. крупные представители клинической медицины стремились быть избранными в АН СССР, а после реформы 2013 г. эти Академии были объединены.

В основе развития медицины лежат успехи фундаментальной науки, включая физику, химию, биологию. Особую роль играет физиология, ибо понимание природы физиологических процессов у здорового человека позволяет понять механизмы дисфункций, найти стратегически правильные тренды в поиске путей восстановления измененных, нарушенных функций. Не менее важное значение имеет физиология человека в разработке проблем адаптации человека к разным экологическим и экстремальным условиям, например условиям микрогравитации в космическом полете или пребывания в условиях высокой температуры, высокого давления, гипербарии [6], что требует разработки физиологических методов и подготовки специалистов в области экстремальной военной медицины.

Представление о физиологических системах, унаследованное от классических работ XIX и XX вв., позволило понять анатомо-физиологические особенности организма человека и изученных животных, эти сведения стали ключевыми в главах учебников и руководств по физиологии. Значение этих принципов важно не только для понимания природы окружающего мира, но оно легло в основу медицины, отклонение от нормы находит выражение в симптомах у пациентов, свидетельствует о возникающих дисфункциях. Каждая из них может найти отражение в отклонении от нормы биохимических показателей сыворотки крови, мочи, ликвора [14, 31, 40, 46]. Другим проявлением дисфункции может быть изменение физических параметров

у пациента – температуры тела, биоэлектрической активности в случае электрокардиограммы, электроэнцефалограммы, показателей при лучевой диагностике. В перечисленных случаях диагностика многоэтапная, она отражает нарушение функции изучаемого органа, пациент попадает к специалисту узкого профиля – пульмонологу, кардиологу и т. п. Это частый случай, что дает возможность выявить заболевание, при котором симптом зависит от нарушения «титульной» функции органа (таблица 1), а так как органы полифункциональны (таблица 2), а в выполнении одной и той же функции могут в разной форме участвовать несколько органов, следует дифференцировать локус повреждения при «распределенной функции». В этом случае по-иному будет построен алгоритм дифференциальной диагностики в клинике, применение клинической физиологии, безусловно, позволить глубже вникнуть в патогенез, а потом и разработать принципы терапии разных форм патологии.

В структуре познания, развития науки у человечества был интерес к базовым ценностям человека – природе ума, основам здоровья. В жажде познания многие века возрастал интерес, и накапливались данные из разных источников о назначении органов у человека и животных, природе болезней. Даже поверхностный взгляд на природу человека требовал ответа на вопрос, зачем нужен тот или иной орган. Стало понятно, что есть базовые функции, и по мере накопления знаний их выполнение связывали с тем или иным органом, выяснилось назначение желудочно-кишечного тракта, легких, сердца, почек. В итоге сформировалась, стала основой учебников анатомо-физиологическая картина мира функций у человека. Развитие сравнительной анатомии, накопление знаний о структуре и функциях органов у человека и животных позволило сформулировать понятие о полифункциональности различных органов (таблица 2). В XIX в. пришло понимание физиологической организации отдельных функций, в XX в. сформировалась концепция организации функциональных систем [1, 5], найдено сходство многих форм деятельности живых систем с кибернетическими устройствами. Были подготовлены учебники физиологии с описанием функциональных систем, их назначением [30]. Оказалось, что, так как органы полифункциональны, необходима иная форма описания существа их физиологической деятельности. В XX в. было обосновано положение о необходимости разграничения функции органов от процессов, обеспечивающих в них каждую из функций [15]. На примере физиологии почек было показано, что почка выполняет более 8 функций, но лишь одна из них экскреторная (таблица 2). Все эти функции осуществляются в почке при разном сочетании 4 процессов – гломерулярной фильтрации, реабсорбции, секреции и синтеза. К числу функций почки относится стабилизация осмотического давления жидкостей внутренней среды, регуляция их объема, концентрации отдельных электролитов и неэлектролитов и др. [19]. Синтез физиологически активных веществ в почке, деградация в ней гормонов обеспечивают ее роль в регуляции многих функций организма. В их числе стабилизация артериального давления, поддержание баланса ионов Са в организме. Известно, что в этих функциях участвуют и другие органы организма, а следовательно, возникает новая конфигурация физиологических систем с участием нескольких органов для осуществления одной

функции [18]. Такой подход имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Требуется исходить не только из стандартного отношения к диагностике: почка – выделение, легкие – дыхание, а из выяснения локуса поражения данной функции. Например, при олигурии причину обычно ищут в нарушении функции почек, но возможен и иной механизм, когда секреция вазопрессина происходит в легких или иных органах, а не в нейрогипофизе, а из-за этого изменяется работа почек, что выявлено, например, при симптоме неадекватной секреции вазопрессина [20]. Тем самым у пациента при такой патологии для лечения олигурии требуется участие пульмонолога, иногда онколога, а не нефролога. Приведенный клинический пример убеждает в необходимости широкого внедрения клинической физиологии.

В нашей практике был ребенок с тяжелым течением пневмонии в пульмонологическом отделении. Температура 39.8°, отказ от питья воды, олигурия, нарушение водного обмена. Проводится инфузионная терапия, состояние ухудшается, приглашаются на консультацию уролог, нефролог. Применяемые лечебные мероприятия не помогают, а клиническая физиология решает проблему. Олигурия с высокой осмоляльностью мочи свидетельствуют об эффективности функции почек, но изменении ее регуляции. Низкая осмоляльность сыворотки крови в этих условиях указывает на повышенную реабсорбцию воды в почке при их полной функциональной сохранности. Поиск локуса нарушений оказался в легких, где активировалась система неадекватной секреции вазопрессина. Разработанный метод лабораторной диагностики позволил выявить увеличенную секрецию вазопрессина. Тем самым лечение должно быть направлено на блокаду эффекта вазопрессина в канальцах почки, например с применением ваптанов. Этот пример свидетельствует, что одним из путей для эффективного и современного лечения может быть анализ картины распределенных физиологических функций. Это требует новых подходов в построениях дифференциальной диагностики.

Необходимо четко разработать алгоритм представлений о «распределенной функции». Когда речь идет о любой из функций в организме человека, клиницист видит и ее образ в отклонении от нормы, дисфункции. Наиболее ясно это проявляется в изменении концентрации в сыворотке крови физиологически значимых веществ, например глюкозы (таблица 5) и т. п. У здорового человека имеются стандартные значения этих показателей (таблица 4), но их изменение наблюдается при патологии как в сыворотке крови, так и в моче (таблица 5, 6).

Таблица 4. Концентрация некоторых электролитов и органических веществ в сыворотке крови у детей первых месяцев жизни и взрослого человека (ммоль/л) [14]

Исследуемое вещество	**Взрослый**	**1 месяц жизни**
Натрий	140-142	139-146
Калий	3.5-5.2	4.1-5.3
Кальций (общий)	2.1-2.55	2.2-2.7
Магний (общий)	0.65-1.0	0.8-1.3
Гидрокарбонат	22-29	11-25

Сульфаты	1	0.5
Глюкоза	4.1-5.9	2.8-4.4
Белок (г/л)	64-83	54-70
Креатинин	80-115	18-35
Мочевина	2.5-8.3	2.0-6.0

Таблица 5. Изменение концентрации глюкозы в сыворотке крови при физиологических и патологических состояниях

Гипогликемия	**Гипергликемия**
Алиментарная	Сахарный диабет 1,2 типа
Алкогольная	Сахарный диабет вторичный (симптоматический)
Атрофия аденогипофиза	Болезнь Иценко-Кушинга
Болезнь Аддисона	Феохромоцитома
Внепанкреатические опухоли с инсулиноподобной активностью	Акромегалия
Рак печени	Синдром Конна
Фиброма	Глюкагонома
Миосаркома	Гигантизм
Рак желудка	Опухоли, секретирующие эстроген, прогестин
Апудомы	Врожденное отсутствие островков Лангерганса в поджелудочной железе
Опухоль надпочечников	Транзиторный диабет новорожденных
Гипоглюкокагононемия	Функциональная незрелость механизма секреции инсулина у новорожденных
Гипопитуитаризм	Панкреатит (острый, хронический)
Гипотиреоз	Фиброз поджелудочной железы при муковисцидозе
Гипофизарный манизм	Рак поджелудочной железы
Гипофизэктомия	Гемохроматоз
Диэнцефальный синдром	Панкреоэктомия
Избыточное введение инсулина	Врожденная липодистрофия
Дефицит соматотропного гормона	Синдром Берардинелли
Краниофарингиома	Синдром Шерешевского-Тернера
Панкреатит (начальная стадия)	Синдром Дауна
Передозировка витамина В1	Синдром Вернера (прогерия взрослых)
Прогрессивный паралич	Синдром Прадера-Вилли
Циклотимия	Сахарный диабет при нарушении толерантности к углеводам
Психозы	Прием тиазидовых препаратов, фенотиазида, метиндола, аспирина, циклофосфомида
Психоэмоциональные травмы	Сахарный диабет беременных
Синдром Шихена	Острое нарушение мозгового кровообращения

Продолжение таблицы 5.

Спонтанная гипогликемия в начальной стадии сахарного диабета	Острый инфаркт миокарда
Субарахноидальное кровотечение	Лихорадка
Травма головного мозга	Гепатита, циррозы печени
Гепатиты, циррозы печени	Эмоциональное возбуждение
Нейрогенная гипогликемия	Ожоги
Энтерит	Шок
Энцефалит	Прием диуретиков (тиазиды, гигротон, бринальдикс)
Гельминтоз	
Мигрень	
Бронхиальная астма	
Голодание	
Неврогенная анорексия	
Почечная первичная глюкозурия	
Галактоземия	
Фруктозурия	
Сахарозурия	
Лейцинурия	
Гликогенозы	
Фетальный эритробластоз	
Идиопатическая семейная гипогликемия	
Сидром Руда	
Карликовость Ларона	
Лепречаунизм	

Таблица 6. Изменение концентрации глюкозы в моче

Увеличение (глюкозурия)	Снижение
Акромегалия	Не наблюдается
Беременность	
Гигантизм	
Гипергликемия с увеличением порога реабсорбции глюкозы	
Гиперплазия коры надпочечников	
Глюкагонома	
Глюкозурия пожилых	
Избыток глюкозы в пище	
Опухоль поджелудочной железы	
Острый инфаркт миокарда	
Отравление СО, морфином	
Панкреатит	
Сахарный диабет	
Сидром Кушинга	
Соматостатинома	

Продолжение таблицы 6.

Сотрясение мозга	
Тиреотоксикоз	
Эмоциональное возбуждение	
Эпилепсия (приступ)	

Рассмотрим еще один ключевой вопрос клинической физиологии, имеющий значение для каждого из ее разделов. Все клетки организма человека соприкасаются с внеклеточной жидкостью, и эффективность их деятельности зависит от постоянства физико-химических показателей сыворотки крови. Лабораторный анализ этих показателей у пациента необходим и при оценке влияния разных форм трудовой деятельности, и при экстремальных условиях среды. В физиологии человека большое внимание уделяют изучению механизмов гомеостаза [2, 16, 23, 42, 43, 45, 47, 50], определению границ нормы для каждого из параметров (таблица 3). Для каждого показателя определяют те физиологические или патологические состояния, при которых этот показатель может быть увеличен или снижен [14, 31]. На приведенных примерах продемонстрировано многообразие причин изменения концентрации глюкозы в сыворотке крови (таблица 5) и в моче (таблица 6), а тем самым – пути принятия клиницистом взвешенного решения.

Одним из канонов классической науки было строгое соблюдение правил применения терминов. Иногда это приводило к более широким трактовкам, но не подмене смысла. Одним из наиболее значимых и широко использованных в физиологии терминов были такие понятия как стресс и гомеостаз. Первое ввел Г. Селье [28], второе связано с именами К. Бернара, сформулировавшего понятие о внутренней среде во второй половине XIX в. и У. Кэннона [45], предложившего для этого явления термин «гомеостаз». Этот термин строго обозначает комплекс физиологических процессов в организме многоклеточных животных и человека, обеспечивающих динамическое постоянство физико-химических параметров жидкостей внутренней среды. Смысл в том, чтобы создать оптимальные условия для функционирования каждой клетки организма. Для этого необходимо стабилизировать состав, объем, температуру жидкости, среды, которая окружает каждую клетку. Когда-то на заре эволюции протоклеток миллиарды лет назад такой средой для одноклеточных было море, появление многоклеточных организмов потребовало для эффективной работы организмов и его клеток формирования «моря» внутри особи, строгой стабилизации околоклеточной среды. Гомеостаз отражает это физиологическое явление [45]. Поэтому словосочетание «гомеостаз клетки» содержит смысловой дефект, например по отношению к тканям – они состоят из клеток и околоклеточной жидкости, назначение которой в том, чтобы создать оптимальные условия функционирования клеток органов, организму необходимо сформировать систему гомеостаза, иными словами, систему, обеспечивающую постоянство физико-химических условий во внеклеточной жидкости, это и есть система гомеостаза. Не может быть гомеостаза клетки, все ее действия связаны с изменением

метаболизма, что приводит к непрерывному изменению параметров внутри клетки, но не околоклеточной среды. Именно гомеостаз, постоянство состава околоклеточной жидкости противостоит этим сдвигам внутри клеток.

Лабораторный анализ показывает значение изучаемых параметров у обследованного и отмечает величину сдвигов по отношению к параметру нормы. Однако оказалось, что значение нормы зачастую расширено, оно зависит от многих причин. Простой пример – концентрация ионов калия в сыворотке крови, по данным справочника, в норме лежит в диапазоне 3.5-5.1 ммоль/л [31]. Сопоставление данных измерения этого показателя у тысяч обследованных здоровых показало, что с возрастом концентрация K^+ снижается в пределах упомянутого выше диапазона. У детей первых дней жизни она около 5.0 ммоль/л, в зрелом возрасте около 4.0 ммоль/л, т. е. изменение почти на 20 %. Снижение этого показателя высокодостоверно при сопоставлении возраста человека в днях и концентрации K^+ в сыворотке крови.

Оказалось, что при некоторых состояниях изменяется не только концентрация, но и Na^+/K^+ отношение в сыворотке крови человека. При острой пневмонии, тяжелом течении ковид-19 оно растет, более того, этот показатель может служить одним из предикторов летального исхода при ковид-19 [21]. Клиническая физиология в подобных ситуациях может оказаться исключительно важной в поиске патогенетического лечения на тех стадиях болезни, когда еще можно предотвратить трагический исход. Сочетание исследований физико-химических параметров жидкостей внутренней среды с параллельным анализом изменения в них концентрации физиологически активных факторов регуляции позволяет разработать алгоритм лечения. Эти данные указывают на необходимость непрерывного учета показателей гомеостаза в практике клинициста, применения подходов персонализированной медицины в отношении гомеостатических лабораторных параметров.

Почки участвуют в поддержании нормальной концентрации веществ, растворенных в плазме крови, благодаря изменению соотношения между их ультрафильтрацией в просвет нефрона, реабсорбцией в кровь из канальцевой жидкости, а для некоторых веществ и секрецией из крови в просвет канальца для последующей экскреции. Кроме почек, в обеспечении баланса веществ в организме, например глюкозы, участвует кишечник, где после расщепления полимеров пищи на моносахара, аминокислоты и т. п. они всасываются в кровь. Тем самым в гомеостазе принимают участие органы желудочно-кишечного тракта, системы регуляции. В конечном счете достигается цель – создание и поддерживание оптимального состава жидкостей внутренней среды, внеклеточной жидкости, необходимого условия эффективного осуществления всех жизненных назначений особи.

Высказанные соображения о распределенной функции между отдельными органами имеют значение при постановке диагноза в случае отклонения функции от нормы и развития заболевания. Такой подход обеспечивает проведение полноценного дифференциального диагноза, взвешенного подхода к лечению. Это включает основные подходы к персонализированной медицине, основы которой можно найти в классической литературе, лекциях, клинических работах выдающихся представителей отечественной медицины и новых принципах персонализированной медицины [38].

Список литературы

1. *Анохин П.К.* Избранные труды: Кибернетика функциональных систем / Под ред. К.В. Судакова. Сост. В.А. Макаров. М.: Медицина, 1998. 400 с.
2. *Баркрофт Дж.* Основные черты архитектуры физиологических функций. М.-Л.: Биомедгиз, 1937. 319 с.
3. *Бирюков Д.А.* Физиологические методы в клинической практике. Л.: Медицина, 1966. 510 с.
4. *Бутова О.* Клиническая физиология. Часть 2. Ставрополь: Северо-Кавказский Федеральный университет (СКФУ), 2015. 292 с.
5. *Винер Н.* Кибернетика, или Управление и связь в животном и машине. М.: Наука, 1983. 344 с.
6. *Газенко О.Г., Григорьев А.И., Никогосян А.Е. и др. (ред.)* Космическая биология и медицина: Совмест. рос.-американ. изд. в 5-ти т. /. Т. 1. М.: Наука, 1994. 526 с.
7. *Гайдар Б.В., Лобзин Ю.В., Мазуров В.И. и др.* Сергей Петрович Боткин. К 180-летию со дня рождения. СПб: Изд. СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2012. 144 с.
8. *Гайтон А.К., Холл Дж. Э.* Медицинская физиология. М.: Логосфера, 2008. 1296 с.
9. *Гриппи М.А.* Патофизиология легких. Пер. с англ. М.: Бином, 1997. 344 с.
10. *Зильбер А.П.* Клиническая физиология для анестезиолога. М.: Медпресс-информ, 2022. 436 с.
11. Камкин А.Г. (ред.) Фундаментальная и медицинская физиология: Учебник для студентов высших учебных заведений. М.: Де'Либри, Т. 1. 2019. 392 с; Т. 2. 2019. 424 с.; Т. 3. 2020. 456 с.
12. *Камкин А.Г., Каменский А.А. /* Ред. Фундаментальная и клиническая физиология. Учебник для вузов. М.: Академия, 2004. 1072 с.
13. *Кеттайл В.М., Арки Р.А.* Патофизиология эндокринной системы. Пер. с англ. М.: Бином, СПб: Невский диалект, 2001. 336 с.
14. *Марина А.С., Наточин Ю.В.* Справочник педиатра. СПб: СпецЛит, 2016. 159 с.
15. *Наточин. Ю. В. (отв. ред).* Физиология водно-солевого обмена и почки / В сер.: Основы современной физиологии. СПб: Наука, 1993. 576 с.
16. *Наточин Ю.В.* Гомеостаз. Успехи физиологических наук 2017; 48(4):3–15. Правильно
17. *Наточин Ю.В.* Целостность. Журнал высшей нервной деятельности 2018; 68(6):775–787.

Natochin Yu.V. Integrity. Neuroscience and Behavioral Physiology 2020;50(1):92–101.

18. *Наточин Ю.В.* Полифункциональность почки и система распределенных функций. Успехи физиологических наук 2022;53(4):3–14.
19. *Наточин Ю.В.* Глава 4 в этой книге. 2023
20. *Наточин Ю.В., Прокопенко А.В., Кузнецова А.А., Шахматова Е.И.* Функциональная диагностика синдрома неадекватной секреции антидиуретического гормона при пневмонии у детей. Педиатрия 2020;99(2):95–101.
21. *Наточин Ю.В., Чернышев О.Б.* Концентрация электролитов в сыворотке крови как предвестник тяжелого течения COVID-19. Нефрология 2022;26(1):27-33.
22. *Орбели Л.А.* Основные задачи и методы эволюционной физиологии. В кн.: Орбели Л.А. Избранные труды в 5 томах. Т. 1. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1961. Стр. 59–68.
23. *Орбели Л.А.* Физиология почек. В кн.: Орбели Л.А. Избранные труды. М., Л.: 1966. Т. 4. С. 85–106.
24. *Пальцев М.А., Паукова В.С., Улумбекова Э.Г. (ред.).* Патология: руководство. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 960 с.
25. *Пирогов Н.И.* Вопросы жизни. Дневник старого врача. М.: НМХЦ им. Н.И. Пирогова, 2010. 440 с.

26. *Рябов С.И., Ракитянская И.А., Шутко А.Н.* Почки и система иммунитета. Л.: Наука, 1989. 150 с.
27. *Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К.* Общая патология человека: Учебник (2-е изд., перераб. и доп.). М.: Медицина, 1997. 608 с.
28. *Селье Г.* На уровне целого организма. М.: 1972. 122 с.
29. *Сепиашвили Р.И.* Физиология иммунной системы. М.: Медицина – здоровье, 2003. 240 с.
30. *Судаков К.В.* Нормальная физиология. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 920 с.
31. *Тиц Н.У.* Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997. 960 с.
32. *Ткачук В.А.* 2023. Глава 11 в этой книге.
33. *Хаитов Р.М.* Физиология иммунной системы. М.: ВИНИТИ РАН, 2005. 428 с.
34. Хендерсон Дж. Патофизиология органов пищеварения. Пер. с англ. М.: Бином, Невский диалект: Санкт-Петербург, 1997. 287 с.
35. *Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В.* Иммунофизиология. УРО РАН: Екатеринбург, 2002. 260 с.
36. *Шейман Дж.* Патофизиология почки. Пер. с англ. М.: Бином, Невский диалект: Санкт-Петербург, 2022. 192 с.
37. *Шиффман Ф.Дж.* Патофизиология крови. Пер. с англ. М.: Бином, СПб: Невский диалект, 2000. 448 с.
38. *Шляхто Е.В. (ред.)* Трансляционная медицина. 2010 г. СПб: ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова, 2010. 416 с.
39. *Шмидт Р.Ф., Ланг Ф., Хекманн М. (ред.)* Физиология человека с основами патофизиологии (пер. с нем.). В 2 томах. М.: Лаборатория знаний, 2021. 1031 с.
40. *Эмануэль В.Л.* Лабораторная диагностика заболеваний почек. Изд. 2-е. СПб. СПбГМУ: Триада, 2006. 247 с.
41. *Эрман М.В.* Симптом – синдром – диагноз. Болезни почек и мочевыделительной системы у детей: руководство для врачей. СПб: СпецЛит, 2020. 229 с.
42. *Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G.* Vasopressin: physiology, assessment, and osmosentation. J. Intern. Med. 2017;282(4):284–297.
43. *Boron W.F., Boulpaep E.L. (Eds.)* Medical physiology. A cellular and molecular approach. Philadelphia.: Saunders, Elsevier, 2009. 1337 p.
44. *Brod J.* The Kidney. London: Butterworth, 1973. 740 p.
45. *Cannon W.B.* Organization for physiological homeostasis. Physiol. Rev. 1929;9:399–431.
46. *Greger R., Windhorst U. (Eds.)* Comprehensive human physiology. From cellular mechanisms to integration. Berlin.: Springer, 1996.
47. *Huntoon Leach C.S., Grigoriev A.I., Natochin Yu.V.* Fluid and electrolyte regulation in spacefligth. San Diego.:Amer. Astronaut. Soc. Publ, 1998. 277 p.
48. *Noble D., Boyd C.A.R.* The Challenge of Integrative Physiology. In: The Logic of Life. Ed. C.A.R. Boyd and D. Noble. Oxford: Oxford University Press, 1993.1–13.
49. *Rose B.D.* Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders. New York.: Mcgraw-Hill, 1984. 702 p.
50. *Smith H.W.* The Kidney: Structure and Function in Health and Disease. New York: Oxford Univ. Press, 1951. 1049 p.

Глава 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ДЫХАНИЯ

А.В. Аверьянов

Легкие являются ключевым органом респираторной системы, выполняющим целый ряд жизненно важных функций. Главная из них – обеспечение газообмена между внешней средой и кровотоком. Выполнение данной задачи реализуется за счет нескольких механизмов – вентиляции, кровообращения в легких и транспорта газов через альвеолярно-капиллярную мембрану.

Вентиляция легких

Вентиляция легких – сложный процесс обеспечения движения потока воздуха в дыхательных путях. Она складывается из взаимодействия работы дыхательных мышц, эластической тяги паренхимы легких и грудной клетки, а также сопротивления воздухоносных путей.

Дыхательная мускулатура включает в себя мышцы, участвующие в процессе вдоха (инспираторные): диафрагму, наружные межреберные, лестничные, грудинно-ключично-сосцевидные и треугольные стернальные мышцы, – и выдоха (экспираторные): внутренние межреберные, мышцы брюшной стенки (наружная и внутренняя косая, прямая и поперечная), а также мышцы гортани (рис. 1) [17]. В спокойном состоянии у здорового человека работающей мышцей является только диафрагма, обеспечивающая вдох. Диафрагма – единственная поперечно-полосатая мышца, находящаяся в состоянии активности как в период сна, так и бодрствования. Поскольку выдох у здоровых происходит пассивно, за счет эластической отдачи растянутой грудной клетки и ткани легких, это позволяет диафрагме получить короткую передышку для восстановления своего энергетического баланса. При физической нагрузке, наличии сопротивления в дыхательных путях, ограничении газообменной поверхности легких на вдохе и выдохе происходит включение в работу дополнительных мышц, при этом диафрагма может выполнять и экспираторную функцию.

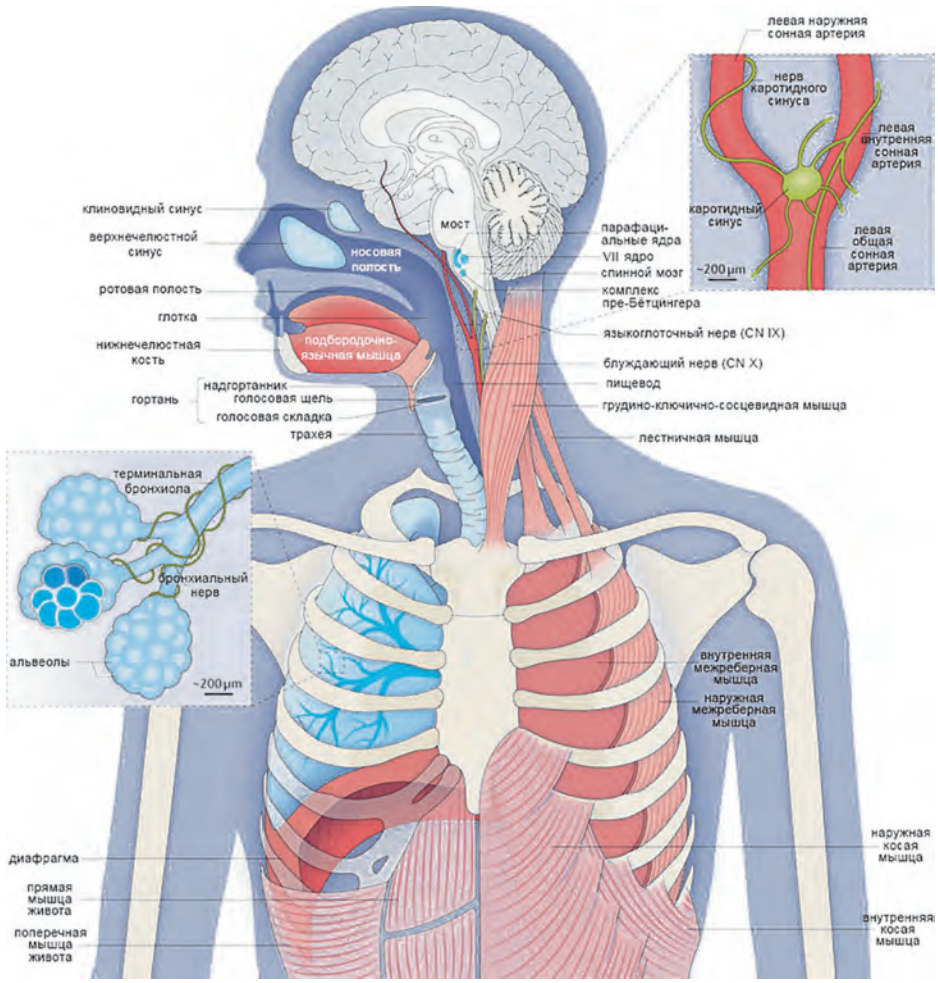

Рисунок 1. Структуры, участвующие в дыхании

При вдохе за счет сокращения и уплощения диафрагмы происходит расширение нижней части грудной клетки в передне-заднем и поперечном направлениях. Это приводит к возникновению отрицательного внутригрудного давления и расправлению легких, обеспечивающему поступление воздуха. Внутригрудное давление по сути – давление в плевральной полости, плевральное давление (Ppl). Оно зависит от взаимодействия дыхательной мускулатуры с эластическими силами отдачи грудной клетки и легочной паренхимы (Pel). Давление воздуха в альвеолах (альвеолярное давление Pal) представляет собой сумму плеврального давления и давления эластической отдачи Pal=Ppl+Pel. Существует также понятие транспульмонального давления (Pl). Оно представляет собой разницу между альвеолярным и плевральным давлением Pl=Pal-Ppl. По сути, именно данный градиент обеспечивает движение воздушного потока из атмосферы в легкие и обратно [25].

Если вдох всегда происходит активно с участием дыхательной мускулатуры, то выдох в условиях спокойного дыхания, как уже упоминалось, обеспечивается эластической тягой паренхимы легких и грудной клетки. Будучи растянутыми после вдоха, благодаря упругости, они стремятся вернуться в исходное положение. Эластические свойства легких определяются присутствием в их каркасе коллагеновых и эластических волокон, имеющих спиралевидную форму, а также поверхностным натяжением тонкого слоя жидкости, покрывающей изнутри поверхность альвеол [41]. Генетически обусловленный дефицит эластина и коллагена (например, при синдроме Эллерса-Данло) или приобретенный (чаще всего при ХОБЛ) приводит к снижению эластической отдачи легких, формированию гиперинфляции и эмфиземы. Что касается сил поверхностного внутриальвеолярного натяжения, то их действие должно было бы привести к коллабированию альвеол на выдохе, если бы в организме не было предусмотрено протективного механизма – образования сурфактанта – белково-липидной субстанции, покрывающей внутреннюю альвеолярную поверхность и снижающую силы поверхностного натяжения. Особенностью сурфактанта является то, что в меньших альвеолярных объемах он вырабатывается более активно. Благодаря этому силы поверхностного натяжения снижаются здесь значительнее, что препятствует перетоку воздуха из малых альвеол в более крупные. Синтез сурфактанта – одна из важных нереспираторных функций легких, реализуемая альвеолоцитами II типа [2]. Следует заметить, что уплотнения в ткани легких, на протяжении долгого времени сохраняющиеся после перенесенного COVID-19, во многом обусловлены зонами альвеолярного коллапса из-за повреждения SARS-CoV2 альвеолоцитов II типа, несущими на своей поверхности рецепторы ангиотензин-превращающего фермента II типа – тропные к S-белку коронавируса. Данный факт был впервые установлен нами в ходе оценки состояния ткани легких методом конфокальной лазерной эндомикроскопии нижних дыхательных путей (альвеолоскопии) у больных, перенесших тяжелые формы COVID-19.

Эластические свойства грудной клетки обусловлены ее расширением во время вдоха, увеличением межреберных промежутков, реберных суставных щелей и натяжением париетальной плевры. На уровне 60% жизненной емкости легких грудная клетка не имеет эластической отдачи, по мере ее расширения эластическая тяга возрастает [26].

Следующий фактор, влияющий на вентиляцию легких, – сопротивление дыхательных путей. Оно складывается из силы трения воздушного потока о внутреннюю поверхность трахеи и бронхов и зависит от длины, площади поперечного сечения, наличия бронхиального секрета, вызывающего дополнительную турбулентность и имеющего разные адгезивные свойства. При увеличении объема легких во время вдоха просвет воздухоносных путей увеличивается и бронхиальное сопротивление уменьшается. По мере деления бронхиального дерева их просвет уменьшается, а общая площадь сечения увеличивается, что также снижает бронхиальную резистентность (рис.2) , параллельно снижается и скорость воздушного потока, он становится ламинарным, что имеет большое физиологическое значение для газообмена.

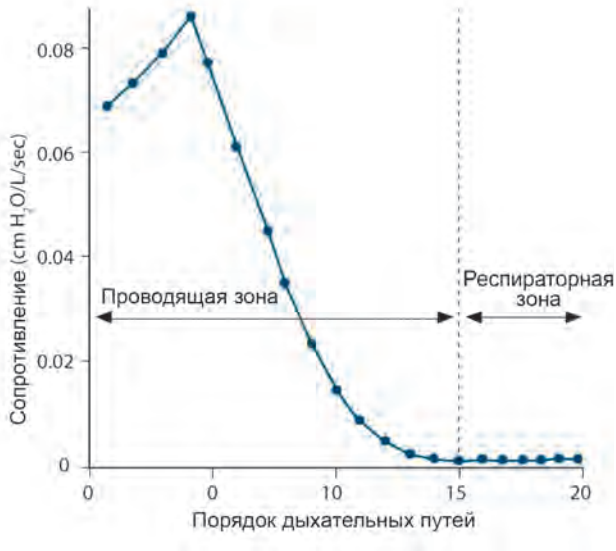

Рисунок 2. Кривая сопротивления воздухоносных путей по мере их деления

Сопротивление воздухоносных путей отличается на разных уровнях. Так, при спокойном носовом дыхании у здорового человека 50% от общего сопротивления приходится на носоглотку. Остальное сопротивление распределяется в соотношении 80% на крупные дыхательные пути и 20% на мелкие дыхательные пути, менее 2 мм в диаметре [57]. Расчет сопротивления дыхательных путей (Raw) проводится путем деления разницы между альвеолярным давлением (Pal) и давлением в ротовой полости Por на объемную скорость воздушного потока (V): Raw=Pal-Por/V и измеряется в см.вд.ст./л/с.

Обсуждение вентиляции легких невозможно без знания их статических и динамических объемов (рис. 3). Дыхательный объем (ДО) – объем воздуха, который человек вдыхает или выдыхает при спокойном дыхании. Объем воздуха, который человек может максимально вдохнуть после предельно глубокого выдоха или максимально выдохнуть после предельного вдоха, носит название жизненной емкости легких (ЖЕЛ). Форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) отличается от ЖЕЛ тем, что измеряется при усиленном (форсированном) выдохе после максимального вдоха. Даже после максимально полного выдоха в легких остается некоторый объем воздуха, который носит название остаточного объема легких (ОО). Объем газа в легких после обычного спокойного выдоха определяется как функциональная остаточная емкость легких (ФОЕ). Разницу между ФОЕ и ОО называют резервным объемом выдоха (РОвыд) – т. е. объем воздуха, который человек может дополнительно выдохнуть после обычного выдоха. Резервный объем вдоха (РОвд) – объем воздуха, который можно вдохнуть дополнительно после обычного вдоха. Сумма ДО и РОвд называется емкостью вдоха (Евд). Наконец, существует понятие общей емкости легких (ОЕЛ), которая складывается из ЖЕЛ и ОО, – полный объем воздуха, находящийся в легких после максимального вдоха [26]. Объемы легких индивидуальны и зависят от возраста, пола, роста, веса, расовой

принадлежности. Их средние величины у здорового человека приведены в таблице 1. При развитии разных заболеваний, не только легких, но и грудной клетки, дыхательной мускулатуры, внутрилегочные объемы меняются, и это положено в основу функциональной диагностики.

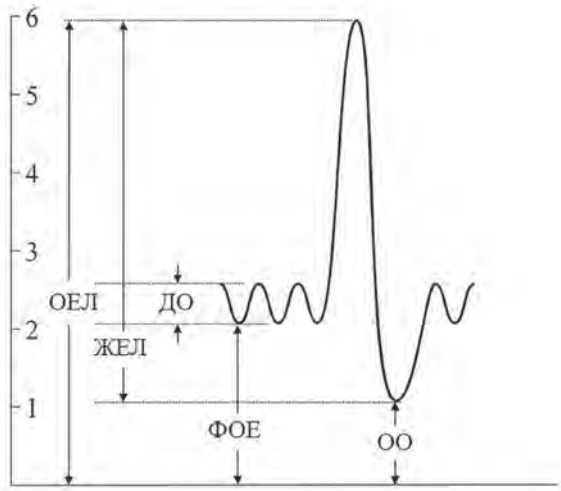

Рисунок 3. Основные объемы легких
ОЕЛ – общая емкость легких, ЖЕЛ – жизненная емкость легких, ДО – дыхательный объем, ФОЕ – функциональная остаточная емкость легких, ОО – остаточный объем.

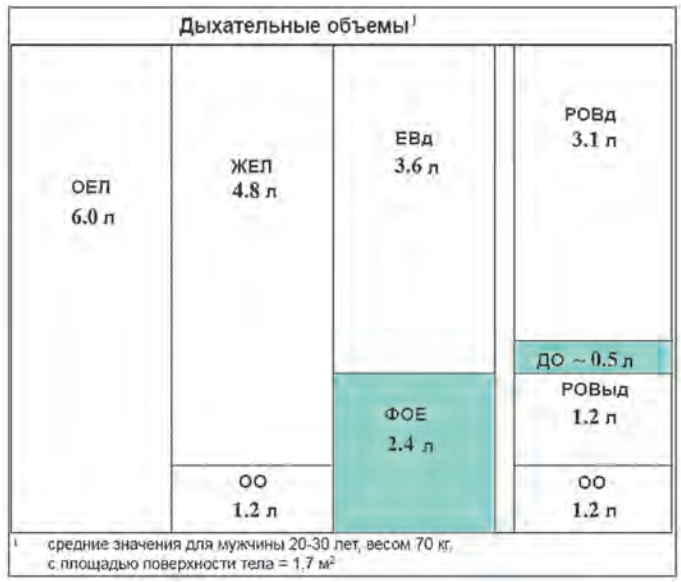

Таблица 1. Объемы легких здорового человека
ОЕЛ – общая емкость легких, ЖЕЛ – жизненная емкость легких, ДО – дыхательный объем, ФОЕ – функциональная остаточная емкость легких, ЕВд – емкость вдоха, РОВд. – резервный объем вдоха, РОВыд. – резервный объем выдоха, ОО – остаточный объем.

Чтобы рассчитать общую вентиляцию легких, необходимо величину ДО умножить на частоту дыхания в 1 минуту, этот показатель также носит название минутного объема дыхания (МОД). Например, при ДО = 500 мл и частоте дыхания 15 в 1 мин МОД= 0,5 х 15= 7,5 л/мин. Однако не весь вдыхаемый воздух достигает газообменной поверхности, часть его остается в проводящих дыхательных путях, так называемом анатомическом «мертвом пространстве». Этот объем у большинства здоровых составляет 130-180 мл. Поэтому альвеолярная вентиляция всегда меньше общей вентиляции легких. В нормальных физиологических условиях не все альвеолы равномерно вентилируются, это обусловлено как гравитационными, так и негравитационными факторами. Нижние отделы легких больше расширяются на вдохе и лучше вентилируются, чем верхние, при этом внутриплевральное давление в области базальных отделов легких выше в 4-5 раз, чем в области верхушек (рис. 4). Считается, что данный факт связан с весом легких, который в силу опоры основания легких на диафрагму уменьшает отрицательное внутриплевральное давление [3]. Неравномерность альвеолярной вентиляции может также быть связана с локальными различиями в анатомии и проходимости мелких воздухоносных путей, размерах и растяжимости альвеол и зависит от частоты и глубины дыхания [13]. Интересно, что в положении лежа на спине вентиляция правого легкого достоверно выше, чем левого, причем данное различие еще больше выражено в положении на правом боку [20].

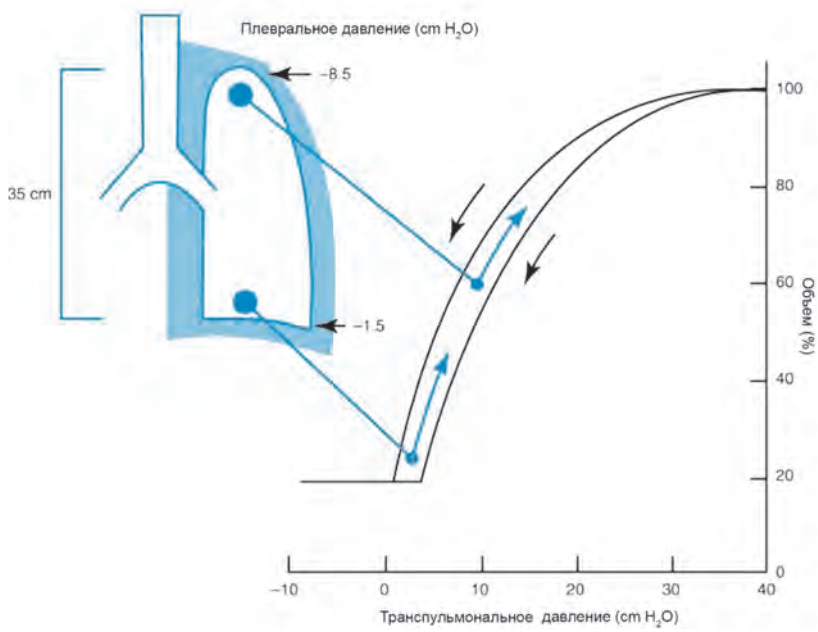

Рисунок 4. Разница внутриплеврального давления у верхушек и оснований легких

Оценка вентиляции легких и влияющих на нее факторов проводится при помощи ряда методов функциональной диагностики. Наиболее простой и часто используемый метод – спирометрия, при котором проводится

определение объемной скорости воздушного потока и некоторых объемов легких (ЖЕЛ, ДО, РОвыд, РОвыд, Евд). Для получения важной дополнительной информации во время проведения спирометрии применяются форсированные дыхательные маневры – выдох и вдох. При этом образуется характерная кривая поток-объем (рис.5), по особенностям которой и измеренным показателям можно судить о состоянии вентиляции легких и бронхиальной проходимости. Данные параметры включают в себя максимальную объемную скорость вдоха (МОС), пиковую скорость выдоха (ПСВ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1) и его отношение к ЖЕЛ (ОФВ1/ЖЕЛ – индекс Тиффно) и ФЖЕЛ (ОФВ1/ФЖЕЛ – индекс Генслера). Дополнительно могут быть измерены максимальные экспираторные потоки на уровне 75, 50 и 25% ФЖЕЛ [16]. Абсолютные показатели, измеренные при спирометрии, существенно отличаются у здоровых людей и зависят от возраста, роста, веса, пола и расовой принадлежности, поэтому их величины следует сравнивать со среднестатистическими параметрами соответствующей половозрастной группы с учетом роста и веса. В программы всех современных спирометров эти данные внесены, поэтому измеренные потоки и объемы сразу выводятся в процентном отношении от средней нормы. Отклонение параметров спирометрии от средних значений обычно приводит к изменению формы кривой поток-объем и свидетельствует об обструктивной или рестриктивной патологии легких.

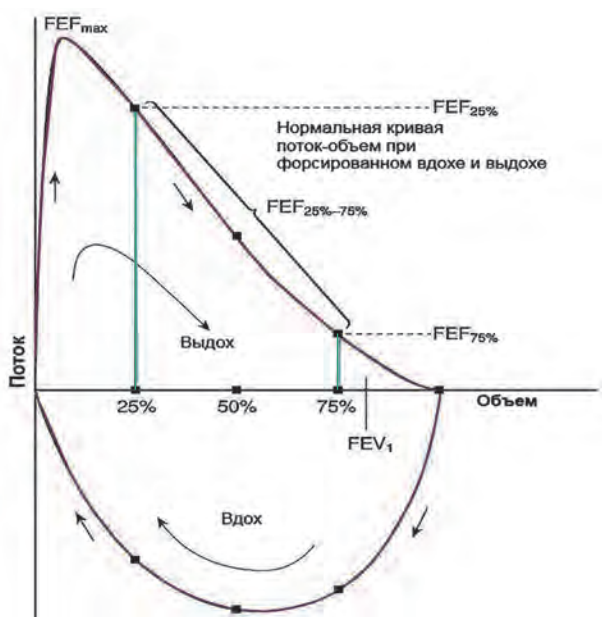

Рисунок 5. Кривая поток-объем здорового человека
FEV1 – объем форсированного выдоха за первую секунду.
FEF max – максимальный форсированный экспираторный поток.
FEF25%-75% – форсированный экспираторный поток на уровне выдоха 25-75% от форсированной жизненной емкости легких.
FEF75% – форсированный экспираторный поток при выдохе на уровне 75% форсированной жизненной емкости легких. 5. Кривая поток-объем здорового человека.

Однако не все объемы легких можно оценить с помощью спирометрии. Для определения ОО, ОЕЛ, ФОЕ используется метод *бодиплетизмографии*, основанный на законе Бойля – Мариотта. Пациент находится в герметичной кабине, дышит через воздуховод, в котором имеется воздушная заслонка, периодически блокирующая воздушный поток. В процессе исследования происходит регистрация изменений давления в ротовой полости (эквивалента альвеолярного давления) и внутригрудного объема во время дыхания с прерывистым сопротивлением, и автоматически рассчитываются искомые объемы легких. При помощи бодиплетизмографии также возможно определение важных параметров вентиляции – сопротивления дыхательных путей и растяжимости легких [8].

Кровообращение в легких

Наряду с вентиляцией важнейшим физиологическим процессом в легких является кровообращение. Кровоток в легких осуществляется преимущественно через систему малого круга кровообращения, имеющего существенные отличия от большого круга. Главные различия в строении артериальных сосудов, с существенно более тонкой стенкой, а также в колоссальном объеме легочных капилляров, которые густо расположены на газообменной поверхности легких, общей площадью 70-145 кв. м [60]. Такое строение связано с гораздо более низкими цифрами давления в легочной артерии, в среднем в 6-7 раз ниже показателей большого круга, и составляет для диастолического 8-10 мм рт. ст., систолического – 20-25 мм рт. ст., среднего – 14-18 мм рт. ст. в состоянии покоя. По мере ветвления артериального русла его суммарный просвет существенно увеличивается, давление падает и кровоток замедляется до минимума в капиллярах легких, благодаря чему увеличивается экспозиция крови на уровне альвеолярно-капиллярной мембраны, что способствует более эффективному газообмену [58].

Давление в капиллярах легких составляет 8-10 мм рт. ст. и зависит от фазы, глубины дыхания и ряда других факторов. На вдохе происходит увеличение объема легких и благодаря тонкой сосудистой стенке- расширение просвета капиллярного русла. Это очень важный физиологический феномен, позволяющий увеличить газообмен при физических нагрузках. Нагрузки вызывают увеличение сердечного выброса, что приводит к повышению артериального давления как в большом, так и малом круге кровообращения. При этом в малом круге происходит снижение сосудистого сопротивления (рис. 6) как за счет расширения действующих капилляров легких, так и открытия нефункционирующих капилляров, что в конечном итоге приводит к усилению перфузии газообменных зон. Однако при глубоком дыхании как на высоте вдоха, так и выдоха сосудистое сопротивление в легких возрастает (рис. 7). Это происходит как за счет сужения капилляров в максимально растянутых альвеолах, так и за счет повышения внутриальвеолярного давления по мере усиления вдоха. При углублении выдоха развивается коллабирование более крупных внеальвеолярных сосудов, что также ведет к росту сосудистого сопротивления [58].

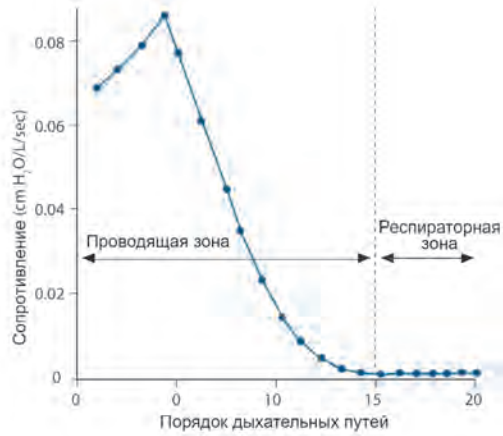

Рисунок 6. Зависимость сосудистого сопротивления от кровотока в легких

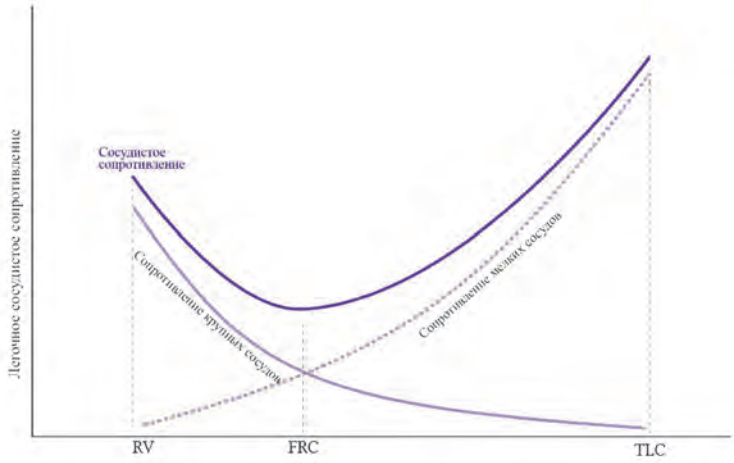

Рисунок 7. Зависимость сосудистого сопротивления в легких от глубины дыхания
RV – остаточный объем; FRC – функциональная остаточная емкость легких; TLC – общая емкость легких.

Одной из особенностей легких является неравномерный кровоток в их разных отделах. У человека в вертикальном положении максимальный кровоток происходит в области базальных отделов легких и линейно уменьшается по направлению к верхушкам. При изменении положения тела, например при переходе в горизонтальном положении, происходит существенное увеличение кровообращения в верхних зонах за счет рекрутмента коллабированных капилляров. Данный факт объясняется разницей в гидростатическом давлении в капиллярах оснований и верхушек легких в вертикальном положении, которая в среднем составляет 30 см вд. ст. Однако не только

артериальное давление в легочных сосудах (Pa) определяет неравномерность кровотока в легких. Имеет значение также альвеолярное давление воздуха (PA) и давление в легочных венах (Pv). В зависимости от их взаимоотношений легкое человека делят на 3 зоны (уровня), которые носят название зон Уэста (рис. 8), по имени авторитетнейшего респираторного физиолога J B West, автора монографии West's Respiratory Physiology: The Essentials , выдержавшую к настоящему времени уже 10 изданий [57]. Первая (верхняя) зона характеризуется более высоким, чем артериальное и венозное, альвеолярным давлением (PA> Pa> Pv). В данной зоне в обычном состоянии перфузия альвеол минимальна, и, соответственно, газообмен находится на низком уровне. Неперфузируемые и не участвующие в газообмене альвеолы носят название альвеолярного мертвого пространства. Во второй (средней) зоне артериальное давление становился выше альвеолярного, но последнее еще превышает венозное (Pa > PA > Pv). Таким образом, поток крови через альвеолярное капиллярное русло определяется градиентом давления между Pa и PA и происходит преимущественно во время систолы правого желудочка. В третьей (нижней) зоне венозное давление становится выше альвеолярного (Pa > Pv > PA), и кровоток не прерывается в диастолу, перфузия становится максимальной. Некоторые исследователи считают, что существует еще 4-я зона – базальный слой легочный ткани, прилежащий к диафрагмальной части плевры. Здесь имеет место неполное расправление альвеол, коллапс экстраальвеолярных сосудов с ростом сосудистого сопротивления, что определяет снижение кровотока и газообмена [19].

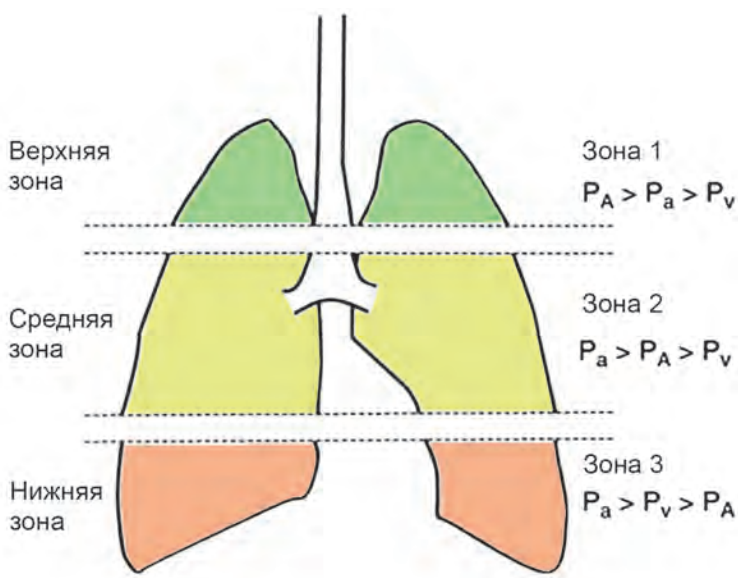

Рисунок 8. Зоны Уэста
Pa – давление в легочных артериях; PA – давление воздуха в альвеолах; Pv – давление в легочных венах.

Обсуждая кровообращение в легких, следует упомянуть о шунтах. В норме шунтирование (обход) кровотока, минуя газообменную поверхность легких, наблюдается через систему бронхиальных артерий, которые могут сбрасывать часть крови в легочные вены, и вен Тебезия, впадающих непосредственно в полость левого желудочка. Фракция венозной крови при этом невелика и не сказывается существенно на оксигенации и РаСО2. Функциональный легочный шунт может наблюдаться в апикальной части зоны 1 Уэста, где кровоток минимален. Физиологическое шунтирование в легких составляет не более 2-3% от общего кровотока с минимальным влиянием на газовый состав крови в легочных венах [42]. Истинным легочным шунтом называется движение венозной крови в обход альвеол, которые могут быть коллабированы либо заполнены патологическим содержимым.

Кровоснабжение бронхиального дерева происходит по системе бронхиальных артерий, правая из которых берет начало от межреберной артерии, а слева обычно имеются две ветви, отходящие от аорты.

Вентиляционно-перфузионное отношение и диффузия газов

Газообмен в легких возможен, если в газообменной зоне паренхимы присутствуют одновременно вентиляция (V) и кровоток (Q). Количественное соотношение между вентиляцией и кровотоком носит название вентиляционно-перфузионного отношения (V/Q). Это очень важный показатель, влияющий как на физиологические процессы у здорового человека, так и нарушения газообмена при различной патологии. Если рассматривать V/Q в целом в легком молодого здорового мужчины среднего роста в состоянии покоя, имеющего объем вентиляции 4 литра/мин, а кровоток 5 л/мин, то величина вентиляционно-перфузионного отношения составит 0,8. Однако это усредненный показатель, в реальности он складывается из V/Q в разных зонах легких, где существенно отличается. У человека в вертикальном положении в верхней зоне объем вентиляции выше, чем объем кровотока, поэтому отношение V/Q более высокое. По мере приближения к основаниям легких нарастает как вентиляция, так и кровоток, однако последний увеличивается более значительно, поэтому V/Q снижается, достигая уровня 0,6 в базальных отделах, тогда как на верхушках легких оно составляет около 3 (рис. 9) [56]. Вентиляционно-перфузионное отношение имеет непосредственное влияние на газообменную функцию легких. Газообмен в легких происходит через альвеолярно-капиллярную мембрану, толщина которой составляет в среднем 1 мкм, что позволяет кислороду и углекислому газу быстро диффундировать из капиллярной крови в альвеолярное пространство и обратно за короткое время экспозиции эритроцитов в капиллярном русле около 0,75 сек [53]. Любопытным фактом является то, что скорость прохождения эритроцитов через капиллярное русло в 1,4 раза выше скорости движения плазмы [39]. В крови, притекающей к капиллярам легких, парциальное давление O_2 составляет около 40 мм рт. ст., а углекислого газа 46 мм. рт. ст., тогда как в альвеолярном воздухе PO_2 составляет в среднем 100 мм рт. ст. Теоретически альвеолярное PCO_2 должно быть равно его давлению в атмосферном воздухе (0,3 мм рт. ст.), однако в силу почти мгновенной диффузии этот показатель значительно выше и установлен на уровне 40 мм рт. ст. Таким образом, градиент парциального давления между капиллярной кровью и альвеолярным

воздухом составляет 60 мм рт. ст. для кислорода и 6 мм рт. ст. для углекислого газа. Поскольку растворимость O_2 и скорость диффузии через альвеолярно-капиллярную мембрану примерно в 20 раз ниже, чем CO_2, такой перепад парциального давления позволяет быстрее оксигенировать капиллярную кровь [39]. Градиент давления газов в альвеолах и капиллярах зависит от общего атмосферного давления, фракции кислорода во вдыхаемом воздухе, общей альвеолярной вентиляции, сердечного выброса и метаболической активности. Важно и то, что нарушение проницаемости альвеолярно-капиллярной мембраны в первую очередь сказывается на диффузии углекислого газа, тогда как снижение перфузии в легких в большей степени влияет на оксигенацию. Исходя из данного факта становится понятно, что поражение нижних отделов паренхимы легких (где кровоток выше) в большей степени нарушает оксигенацию крови.

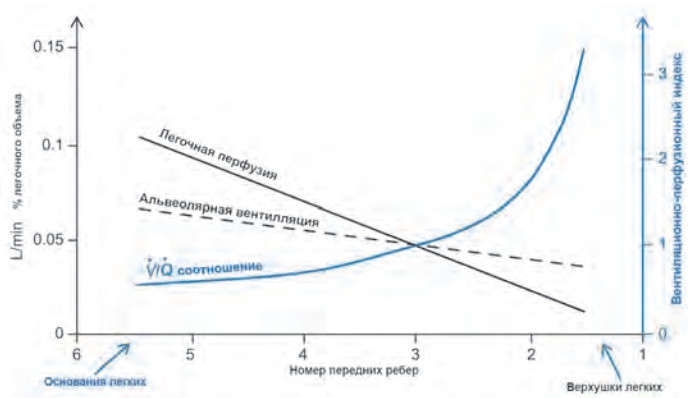

Рисунок 9. Соотношение вентиляции и перфузии на разных уровнях легких
V/Q – вентиляционно-перфузионное отношение.

На диффузию газов, помимо градиента давления газов в крови и альвеолярном воздухе, влияют общая площадь газообменной поверхности, зависящая от вовлечения в вентиляцию альвеол и капилляров в кровоток, толщина альвеолярно-капиллярной мембраны, увеличивающаяся с возрастом и при множестве паренхиматозных болезней легких, уровень гемоглобина и вязкость крови. В целом существуют 4 основные процесса, снижающих транспорт газов в легких, – гиповентиляция, нарушенная диффузия, шунт и неадекватность вентиляционно-перфузионного отношения [45].

Важным практическим методом является оценка диффузионной способности легких (ДСЛ). ДСЛ, или трансфер-фактор (термин, чаще используемый среди европейских исследователей), определяется как способность газа к диффузии через альвеолярно-капиллярную мембрану в результате градиента парциального давления и может быть представлен в виде формулы: ДСЛ = скорость переноса газа/градиент парциального давления газа (мл/мин/мм рт. ст.) [31]. В норме для кислорода ДСЛ составляет 20-30 мл/мин/мм рт. ст [53]. При физических нагрузках данный показатель может возрастать максимально до уровня 100-120 мл/мин/мм рт. ст., что связано с увеличением как вентиляции, так и перфузии [52].

Поскольку диффузия кислорода зависит в большей степени от кровотока, измерение ДСЛ проводят путем оценки диффузии углекислого газа, транспорт которого нарушается быстрее при повреждении газообменной поверхности. В подавляющем большинстве случаев для этого используется метод одиночного вдоха. При этом испытуемый делает максимальный вдох смесью, содержащей 0,3% CO и 10% гелия (гелий нужен для определения альвеолярного объема, поскольку не поглощается в альвеолах), задерживает дыхание на 10 секунд, выдыхает, после чего определяется скорость вымывания CO из альвеолярного воздуха по разнице концентраций при вдохе и выдохе. Существуют факторы, которые могут влиять на измерение ДСЛ, приводя к ложно завышенным или заниженным показателям. К ним относятся [31]:

1. Присутствие крови в альвеолярном пространстве (например, при диффузных альвеолярных геморрагиях). В этом случае происходит поглощение CO внутриальвеолярным гемоглобином и определяемая величина трансфер-фактора увеличивается.

2. Повышение уровня эндогенного CO при интенсивном курении или гемолизе, когда снижается захват вдыхаемого газа.

3. Низкая концентрация гемоглобина в крови, при этом происходит снижение трансфер-фактора при нормальном состоянии альвеолярно-капиллярной мембраны.

Регуляция дыхания

Регуляция дыхания происходит через сенсорную систему, включающую периферические, центральные хеморецепторы и рецепторы растяжения и проприоцепции, и связанные с нею центры контроля дыхания (рис.1, таблица 2). Каротидные тельца, расположенные в местах ветвления сонных артерий, а также аортальные гломусы, контролируют парциальное давление кислорода, углекислого газа, PH в артериальной крови и уровень глюкозы, посылая сигналы в ствол мозга через языкоглоточный и аортальный нервы. Хемосенсорные нейроны ствола мозга и глия также реагируют на минимальные изменения PaCO2 и PH в спинномозговой жидкости. Сигналы от хемосенсорных нейронов передаются в области, отвечающие за регуляцию дыхательной мускулатуры, обеспечивающие ритмичное дыхание и поддержание газового гомеостаза – комплекс пре-Бетцингера (PreBotC) и Бетцингера, ретротрапезоидный ядро-парафациальный дыхательный групповой комплекс (RTN/pFRG) (нейросети продолговатого мозга) и парабрахиальные ядра (на стыке среднего мозга и моста) (рис. 10) [1]. Нейроны дыхательного центра разделены на 3 группы – дорсальную дыхательную группу (отвечает за вдох, постоянно активна), вентральную дыхательную группу (отвечает за вдох и выдох, неактивна при спокойном дыхании, активируется для его усиления), респираторная группа варолиева моста (контролирует частоту, характер дыхания, выполняет тормозящие функции) [37]. Следует отметить, что центры регуляции дыхания существенно более чувствительны к колебаниям PaCO2 и связанным с ним PH, чем к PaO2. Так, увеличение PaCO2 с 40 до 41 мм рт. ст. приводит к увеличению вентиляции на 40% (с 5 до 7 литров в минуту) [11]. Дыхательные центры также получают импульсацию от механосенсорных и проприорецепторов, расположенных в дыхательных мышцах и гладкой мускулатуре бронхиального дерева. Благодаря данным сигналам,

передающимся через ветви блуждающего нерва, происходит достижение оптимальных дыхательных объемов. Стимуляция ядер дыхательного центра также осуществляется гормонами стресса из гипоталамуса и импульсацией от коры головного мозга.

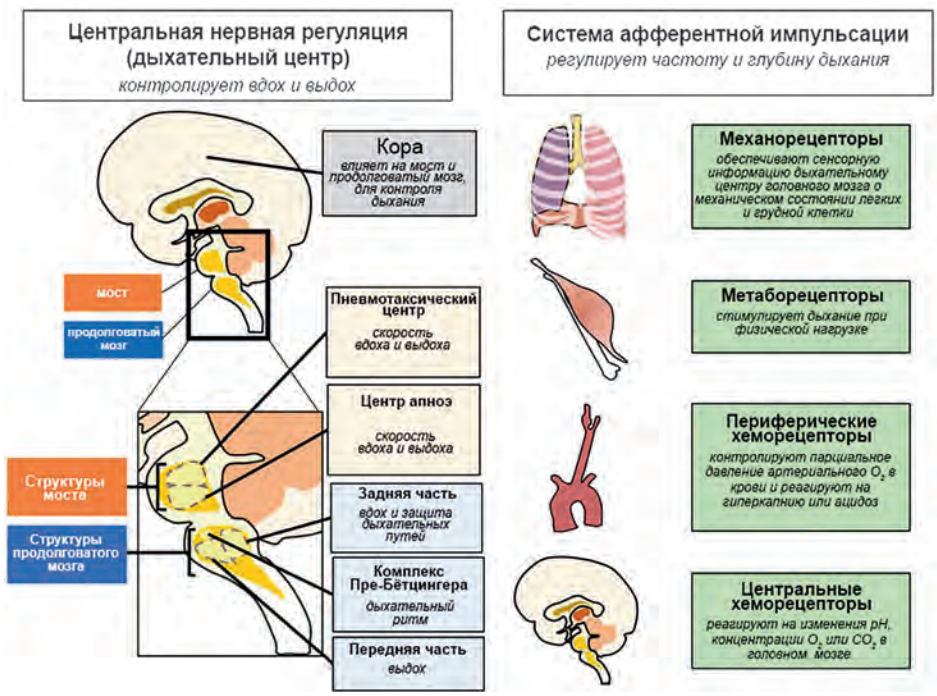

Рисунок 10. Рецепторы и центры регуляции дыхания

Таблица 2. Мозговые центры контроля и регуляции дыхания (адаптировано из https://derangedphysiology.com)

Центр	**Роль**	**Эфференты и эффекторы**
Nucleus retroambigualis	Экспираторная	Контралатеральные экспираторные мышцы
Nucleus paraambigualis	Инспираторная	Контралатеральные инспираторные мышцы
Nucleus ambiguous	Дилатация воздухоносных путей	Блуждающий нерв к мышцам глотки, гортани и язычка
Pre-Bötzinger complex	Поддержка спонтанного ритма дыхания	Межнейронный комплекс, связывающий другие центра дыхания
Bötzinger complex	Тормозящая функция	Ингибитор межнейронного взаимодействия и диафрагмальных нейронов
Респираторная группа моста	Интеграция нисходящего контроля дыхания с корой головного мозга	Межнейронные соединения с другими группами контроля дыхания
Кора головного мозга	Волевой и поведенческий контроль дыхания	Респираторная группа моста

Нереспираторные функции легких

Помимо газообмена, важнейшими функциями легких являются очистительная, иммунная, метаболическая и некоторые другие.

Очистительная функция легких состоит в задержке и выведении взвесей и газообразных веществ, содержащихся во вдыхаемом воздухе. Известно, что 1 м^3 воздуха жилого помещения содержит в среднем 259 мкг частиц размером около 10 мкм и 202 мкг частиц размером 2,5 мкм. Как известно, именно частицы размером 2,5-10 мкм оседают на разных уровнях воздухоносных путей, от 0,5 до 2 мкм оседают в альвеолярном пространстве, менее 0,5 мкм возвращаются во внешнюю среду с потоком выдыхаемого воздуха [18]. При нахождении в обычном жилье человек вдыхает в среднем 3,3 мг таких взвесей в день [30]. Очистка бронхиального дерева от осажденных примесей происходит в первую очередь за счет мукоцилиарного клиренса – механизма, включающего в себя работу секреторных желез слизистого и подслизистого слоя, вырабатывающих эндобронхиальный секрет в объеме 50-70 мл в сутки и функцию реснитчатого эпителия нижних дыхательных путей, благодаря которому осажденные из вдыхаемого воздуха на поверхности слизистой оболочки мелкие частицы поднимаются до уровня глотки, сглатываются и выводятся через желудочно-кишечный тракт [31]. При избытке секрета или поломках мукоцилиарного транспорта дополнительным механизмом очистки нижних дыхательных путей является кашлевой рефлекс. Клеточные элементы, в первую очередь альвеолярные и бронхиальные макрофаги, участвуют в механизме фагоцитоза и также способствуют элиминации мелких частиц из бронхиального дерева и альвеолярного пространства.

Летучие субстанции, поступающие в кровь из разных источников, наряду с углекислым газом способны диффундировать через альвеолярно-капиллярную мембрану и выделяться с выдыхаемым воздухом. К ним относятся токсические и ароматические вещества, например алкоголь, эфирные масла и многие лекарственные препараты, большинство из которых используется в анестезиологической практике (лидокаин, пропофол, фентанил, допамин и др.) [10].

Иммунные функции легких состоят прежде всего в противоинфекционной защите. Легкие являются резервуаром нейтрофилов, содержат большое количество макрофагов, на слизистых оболочках дыхательных путей представлен IgA. Легочный сурфактант обладает противоинфекционными свойствами как в отношении бактерий, так и вирусов, включая SARS-CoV2 [5]. Наконец, резидентные стволовые клетки в легких составляют дополнительный защитный барьер, как за счет активации ключевых клеток иммунной системы, так и способности продуцировать прямые антимикробные пептиды – кателицидин, гепцидин, β-дефензин и липокалин 2[6].

Метаболическая функция легких включат в себя как синтез и активацию целого ряда важных биологических субстанций, так и утилизацию некоторых органических соединений. Среди синтезируемых в легких активных молекул можно выделить гепарин (образуется тучными клетками), сурфактант (альвеолоцитами II типа), активаторы плазминогена и оксид азота (эндотелием микроциркуляторного русла легких) [28, 50]. В легких активируются ангиотензин-1, конвертируясь в ангиотензин II, ахидоновая кислота и инактивируются сериновые протеазы, норадреналин, лейкотриены, аденозин и брадикинин [59].

Фильтрационная функция легких состоит в задержке различных микроэмболов из легочного кровотока, недопущения их дальнейшего движения в органы большого круга кровообращения. Благодаря данному механизму микротромбы, жировые частицы, опухолевые клетки, септические эмболы и др. взвеси размером более 50 мкм оседают на уровне капиллярного русла с последующим лизисом (мелкие тромботические и жировые частицы) или развитием нового гематогенно распространенного процесса в легких (метастазы, очаги пневмонии) [29].

Респираторная физиология в особых условиях

Описанная выше физиология легких может меняться в зависимости от внешних и внутренних условий функционирования. Среди наиболее частых следует рассмотреть возраст, беременность и пребывание в условиях повышенного и пониженного атмосферного давления.

Влияние возраста

У новорожденных физиология легких отличается от взрослого человека более высоким сопротивлением дыхательных путей, большим анатомическим мертвым пространством (около 3 мл/кг против 2,2 мл/кг), сниженным легочным комплайнсом (за счет меньшего количества сурфактанта) при увеличении эластической отдачи грудной клетки (за счет большей хрящевой составляющей ребер) [33, 36]. Также в силу сохраняющегося открытым *ductus arteriosus* наблюдается естественный шунт до 25% от общего легочного кровотока [32]. Однако это не сказывается на оксигенации крови, поскольку газообмен в легочной ткани происходит более интенсивно в силу высокого уровня гемоглобина (около 190 г/л) и гематокрита, а также более сильной связи с кислородом фетального гемоглобина [9]. Работа дыхания у новорожденных повышена. Частота дыхательных движений составляет 30-60 в 1 мин, что при таком же, как у взрослых, дыхательном объеме (6 мл/кг) приводит к существенному росту общей вентиляции легких [9]. Такая частота дыхания обеспечивается особым строением и функционированием диафрагмы, содержащей меньше, чем у взрослых, мышечных волокон I типа (менее «выносливых») и имеющей более высокую электрическую активность [34]. Наконец, частота дыхания у новорожденных менее зависима от уровня CO2 в крови, чем у взрослых, и парадоксальным образом наблюдается снижение минутного объема дыхания при гипоксии. Кроме того, у них отмечается большая частота эпизодов апное [40, 49].

По мере *старения* анатомические и физиологические свойства легких меняются. Уменьшается число ресничек в бронхах, повышается порог кашлевого рефлекса, что ведет к снижению мукоцилиарного клиренса, одновременно увеличивается бронхиальная реактивность, способствующая спазмированию бронхов в ответ на внешние раздражители. С возрастом грудная клетка теряет эластичность и растяжимость, происходит кальцификация реберных сочленений, развивается старческий кифоз. Так, только у 23% лиц старше 75 лет на рентгенограммах грудной клетки отсутствуют признаки кифоза [12]. Также снижается общая мышечная масса, включая мышцы дыхательной мускулатуры, и теряется их контрактильная способность [38]. В самой ткани легких происходит редукция эластических волокон, что приводит к расширению альвеолярных пространств, снижению эластической

отдачи легких и появлению признаков сенильной эмфиземы даже у никогда не куривших пациентов [14]. В совокупности возрастные структурные изменения определяют функциональные отличия у лиц старческого возраста. К ним относятся снижение жизненной емкости легких, объема форсированного выдоха за 1-ю секунду, увеличение остаточного объема легких и снижение диффузионной способности [46]. Вентиляционно-перфузионная неравномерность также нарастает, появляется больше участков с недостаточной вентиляцией, что сказывается на снижении газообмена [21]. Вентиляционнный ответ на гипоксию и гиперкапнию у пожилых пациентов также слабее, чем у людей молодого и среднего возраста [22].

Влияние беременности

Беременность, особенно на поздних сроках, оказывает существенное влияние на работу легких. Изменения в респираторной физиологии обусловлены, с одной стороны, новым гормональным фоном, а с другой – механическими факторами, связанными с ростом плода. Высокий уровень прогестерона у беременных определяет повышенную чувствительность дыхательного центра к колебаниям СО2 и возрастание частоты дыхания в среднем до 15-17 дыхательных движений/мин и дыхательного объема на 30-50% (до 10 мл/кг) [23]. В результате снижается концентрация углекислого газа и повышается концентрация кислорода до 101-108 мм рт. ст. в альвеолярном воздухе и крови, причем этот физиологический феномен возникает уже в первом триместре беременности [54].

В третьем триместре дыхательные пути расширяются, что, по-видимому, обусловлено снижением мышечного тонуса бронхиального дерева за счет гиперпродукции простогландинов Е1 и Е2 [55]. Как следствие, увеличивается объем анатомического мертвого пространства, однако функциональная остаточная емкость легких во второй половине беременности уменьшается, что связано с более высоким (до 5 см) стоянием диафрагмы. Однако благодаря расширению грудной клетки, за счет подъема нижних ребер общая емкость легких снижается минимально [15, 24]. Показатели спирометрии (ФЖЕЛ, ОФВ1, пиковая скорость выдоха) при нормально протекающей беременности меняются незначительно.

Влияние пониженного атмосферного давления

Согласно данным ВОЗ, ежегодно около 35 млн человек совершают путешествия на высоты более 3000 м над уровнем моря, а порядка 81,6 млн проживают на высоте более 2500 м [47, 51]. Считается, что те или иные физиологические изменения, прежде всего сердечно-сосудистой и дыхательных систем, отмечаются уже на высоте более 1500 м [44]. В целом ответ человеческого организма на пребывание в условиях высокогорья довольно хорошо изучен. Он заключается в увеличении сердечного выброса и частоты сердечных сокращений, учащении и углублении дыхания, умеренном повышении системного и легочного артериального давления в ответ на гипоксию атмосферного воздуха. Кроме того, происходит повышение уровня гемоглобина и эритроцитов в крови, однако данная реакция развивается обычно после 7 дней пребывания в высокогорье [35, 43]. Выраженность этих реакций зависит от уровня атмосферной гипоксии и скорости ее наступления, однако существенная роль отводится и индивидуальным генетическим факторам [47].

Благодаря перечисленным адаптационным реакциям обеспечивается тканевая компенсация дефицита кислорода во вдыхаемом воздухе, одновременно за счет увеличения минутного объема дыхания происходит вымывание углекислого газа из крови и снижение уровня бикарбоната в сыворотке. Однако на высотах более 2100 м компенсаторных механизмов становится недостаточно, и сатурация кислорода начинает снижаться. На основании исследования Calbet et al. на высоте 5260 м расчетная сатурация составляет 85,5%, при нормальных значениях – 95-100% [4, 27]. До высоты 4200 м дыхательные объемы, показатели бронхиальной проходимости и диффузионная способность легких у здорового человека существенно не меняются [48].

В данной главе мы постарались кратко и доступно изложить основы физиологии легких. В силу непрерывного сообщения с внешней средой легкие являются наиболее уязвимым внутренним органом. Описанные выше физиологические механизмы позволяют им противостоять множеству экзогенных факторов, выполняя свою главную роль – обеспечение газообмена. Адаптационные резервы легких очень высоки как в отношении вентиляции, так и перфузии, неслучайно многие болезни, поражающие легочную ткань, на ранних стадиях протекают бессимптомно. Знание основ физиологии легких является неотьемлемой частью современного медицинского образования и входит в обязательный перечень теоретических вопросов при аттестации врачей как в России, так и за рубежом.

Список литературы

1. *Alheid GF, McCrimmon DR.* The chemical neuroanatomy of breathing. Respir Physiol Neurobiol. 2008; 164(1–2):3–11
2. *Bernhard W.* Lung Surfactant: Function and Composition in the Context of Development and Respiratory Physiology. Ann. Anat. Anat. Anz. 2016; 208:146–150.
3. *Bryan AC, Milic-Emili J, Pengelly D.* Effect of gravity on the distribution of pulmonary ventilation. J Appl Physiol. 1966; 21:778–84.
4. *Calbet JA, Boushel R, Radegran G, et al.* Why is VO2 max after altitude acclimatization still reduced despite normalization of arterial O2 content? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284:R304–16.
5. *Calkovska A, Kolomaznik M, Calkovsky V.* Alveolar type II cells and pulmonary surfactant in COVID-19 era. Physiol Res. 2021 Dec 16; 70(S2):S195-S208
6. *Chow L, Johnson V, Impastato R, et al.* Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells Stem Cells Transl Med. 2020 Feb; 9(2):235-249.
7. *Cotes J, Chinn D, Quanjer P, et al.* Standardization of the measurement of transfer factor (diffusing capacity*). Eur Respir J* 1993*;* 6*:* Suppl. 16*,* 41–52
8. *Criée CP, Sorichter S, Smith HJ, et al.* Body plethysmography--its principles and clinical use Respir Med. 2011 Jul; (7):959-71.
9. *Davis RP, Mychaliska GB.* Neonatal pulmonary physiology. Semin Pediatr Surg. 2013 Nov; 22(4):179-84.
10. *Deepak J , Raju K, Hari K. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, Volume 13, Issue 3, June 2013, Pages 98–102
11. *Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL.* Breathing matters Nat Rev Neurosci. 2018 Jun;19(6):351-367.

12. *Edge J, Millard F, Reid L.* The radiographic appearance of the chest in persons of advanced age. Br J Radiol 1984; 37: 769-774.

13. *Galvin I, Drummond GB, Nirmalan M.* Distribution of blood flow and ventilation in the lung: gravity is not the only factor. Br J Anaesth. 2007; 98:420–428.

14. *Gillooly M, Lamb D.* Airspace size in lungs of lifelong non-smokers: effect of age and sex. Thorax. 1993; 48:39–43.

15. *Gilroy RJ, Mangura BT, Lavietes MH.* Rib cage and abdominal volume displacements during breathing in pregnancy. Am Rev Respir Dis 1988; 137: 668–672.

16. *Graham B.L., Steenbruggen I., Miller M.R. et al.* Standardization of spirometry 2019. Update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2019; 200 (8): e70–e88.

17. *Green M, Moxham J.* The respiratory muscles. Clin Sci Lond) 1985; 68(1):1–10

18. *Hatch,* T.F. "Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract." Bacteriological reviews 25.3 (1961): 237.

19. *Hughes JM, Glazier JB, Maloney JE, West JB.* Effect of lung volume on the distribution of pulmonary blood flow in man. Respir Physiol 4:58–72, 1968.

20. *Ides KM, De Backer WA, Lanclus M et al.* The effect of posture on airflow distribution, airway geometry and air velocity in healthy subjects. BMC Pulm Med. 2022 Dec 15; 22(1):477.

21. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. Eur Respir J. 1999 Jan; 13(1):197–205.

22. *Janssens J-P.* Aging of the Respiratory System: Impact on Pulmonary Function Tests and Adaptation to Exertion. Clin Chest Med 26 (2005) 469–484.

23. *Jensen D, Duffin J, Lam YM, et al.* Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. Respir Physiol Neurobiol 2008; 161: 76–86.

24. *Jensen D, Webb KA, Davies GA, et al.* Mechanical ventilatory constraints during incremental cycle exercise in human pregnancy: implications for respiratory sensation. J Physiol 2008; 586: 4735–4750.

25. *Loring SH, Topulos GP, Hubmayr RD.* Transpulmonary Pressure: The Importance of Precise Definitions and Limiting Assumptions. Am J Respir Crit Care Med. 2016 Dec 15; 194(12):1452–145

26. *Lutfi MF.* The physiological basis and clinical significance of lung volume measurements. Multidiscip Respir Med. 2017; 12:3.

27. *Martin, D; Windsor, J* From mountain to bedside: understanding the clinical relevance of human acclimatisation to high-altitude hypoxia. Postgraduate Medical Journal. (2008) 84 (998): 622–627.

28. *Metcalfe DD, Lewis RA, Silbert JE, et al.* Isolation and characterization of heparin from human lung J Clin Invest. 1979 Dec; 64(6):1537 –43.

29. *Montagnana M, Cervellin G, Franchini M, Lippi G.* Pathophysiology, clinics and diagnostics of non-thrombotic pulmonary embolism. J Thromb Thrombolysis. 2011 May; 31(4):436–44.

30. *Morawska, L., et al.* "Airborne particles in indoor environment of homes, schools, offices and aged care facilities: The main routes of exposure." Environment international 108 (2017):75–83.

31. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 6-th edition Elsevier inc., 1 volume, p. 69–70

32. *Nelson NM, Prod'hom LS, Cherry RB, et.* Al. Pulmonary function in the newborn infant: the alveolar-arterial oxygen gradient J Appl Physiol (1985). 1963 May 1; 18(3):534–538.

33. *Numa AH, Newth CJ.* Anatomic dead space in infants and children J Appl Physiol (1985). 1996 May; 80(5):1485–9.

34. *Oda A, Parikka V, Lehtonen L, Soukka H.* Rapid respiratory transition at birth as evaluated by electrical activity of the diaphragm in very preterm infants supported by nasal CPAP. Respir. Physiol. Neurobiol. 2018; 258:1–4.

35. *Palmer BF.* Physiology and pathophysiology with ascent to altitude. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2010; 340(1):69–77.

36. *Pas AB, Davis PG, Hooper SB, Morley CJ.* From liquid to air: breathing after birth J Pediatr. 2008 May;152(5):607–11.

37. *Pocock, Gillian; Ricmhards, Christopher D.* (2006). Human physiology: the basis of medicine (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press. p. 332.

38. *Polkey MI, Harris ML, Hughes PD, et al.* The contractile properties of the elderly human diaphragm. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1560–564.

39. *Presson RG Jr, Graham JA, Hanger CC et al.* Distribution of pulmonary capillary red blood cell transit times. J Appl Physiol 1995 Aug; 79(2):382–8.

40. *Ramanathan R, Corwin MJ, Hunt CE, et al.* Cardiorespiratory events recorded on home monitors: comparison of healthy infants with those at increased risk for SIDS. JAMA. 2001; 285:2199–2207.

41. *Rodarte JR,Noredin G,Miller C, et al.*, Lung elastic recoil during breathing at increased lung volume. J Appl Physiol. 1999 Oct; 87(4):1491–5.

42. *Sarkar M, Niranjan N, Banyal PK.* Mechanisms of hypoxemia Lung India. 2017 Jan-Feb; 34(1):47–60.

43. *Savourey G, Garcia N, Besnard Y, Guinet A, Hanniquet A-M, Bittel J.* Pre-adaptation, adaptation and de-adaptation to high altitude in humans: cardio-ventilatory and haematological changes. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1996; 73(6):529–535

44. *Schoene RB.* Illnesses at high altitude. *Chest*. 2008; 134(2):402–416

45. *Sharan M, Singh MP.* Numerical simulation of pulmonary O2 and CO2 exchange. Int J Biomed Comput. 1985 Jan; 16(1):59–80.

46. *Sharma G, Goodwin J.* Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. Clin Interv Aging. 2006; 1(3):253–60.

47. *Sharma V, Varshney R, Sethy NK*. Human adaptation to high altitude: a review of convergence between genomic and proteomic signatures. Hum Genomics. 2022 Jul 15; 16(1):21.

48. *Sonmez GT, Ozen S, Yuktasir B, Yalcin B, Ozen G, Sonmez S, et al.* The effects of high altitude climbing on respiratory parameters. *Medicina Sportiva*. 2009; 13(1):49–53.

49. *Sovik S, Lossius K.* Development of ventilatory response to transient hypercapnia and hypercapnic hypoxia in term infants. Pediatr Res. 2004; 55:302–309.

50. *Takahashi, Kimiko, et al.* "Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 275.1 (1998): L47–L54.

51. *Tremblay, JC; Ainslie,* PN (2021). "Global and country-level estimates of human population at high altitude". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 118 (18): e2102463118.

52. *Turino, G. M.,* Bergofsky EN, Goldring R M, Fishman A P. "Effect of exercise on pulmonary diffusing capacity." Journal of Applied Physiology18.3 (1963):447–456.

53. *Weibel ER, Federspiel WJ, Fryder-Doffey F, et al.* Morphometric model for pulmonary diffusing capacity. I. Membrane diffusing capacity. Respir Physiol 1993; 93: 125–149.

54. *Weinberger SE, Weiss ST, Cohen WR, et al.* Pregnancy and the lung. Am Rev Respir Dis 1980; 121:559–581

55. *Weinberger SE.* Kolarzyk E, Szot WM, Lyszczarz J. Lung function and breathing regulation parameters during pregnancy. Arch Gynecol Obstet 2005; 272: 53–58.

56. West J B State of the art: ventilation-perfusion relationships Am Rev Respir Dis. 1977 Nov; 116(5):919–43.

57. West JB: Respiratory Physiology: The Essentials, 10th edition. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins 2015, P224.

58. West JB. Comparative physiology of the pulmonary circulation. Compr Physiol. 2011 Jul; 1(3):1525–39.

59. Wijnands WJ. The metabolic function of the lung. Pharm Weekbl Sci. 1987 Apr 24; 9(2):61–4.

60. Williams PL; Warwick R; Dyson M; Bannister LH. (1989). Gray's Anatomy (37th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 1278–1282.

Глава 3. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РЕМОДЕЛИРОВАНИИ СЕРДЦА И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОМ КОНТИНУУМЕ

Ю.Н. Беленков, М.В. Кожевникова, Е.О. Коробкова

Введение

Представление о развитии и прогрессировании заболеваний сердца, независимо от типа перегрузки (давлением или объемом), а также первичного поражения миокарда базируется в настоящее время на концепциях ремоделирования сердца и сердечно-сосудистого континуума.

Понятие ремоделирования сердца, описанное почти 50 лет назад N. Sharpe для пациентов, перенесших инфаркт миокарда, в настоящее время распространяется для всех заболеваний сердца и определяется как молекулярные, клеточные и интерстициальные изменения, которые клинически проявляются в виде изменений размера, формы и функции сердца в ответ на действие патологических факторов. Как видно из определения, молекулярные и гуморальные сдвиги предшествуют изменению глобальной структуры и функции, поэтому для правильного понимания развития ремоделирования важна концепция сердечно-сосудистого континуума, предложенная в 1991 году V. Dzau и E. Braunvald (рисунок 1) [15].

Рисунок 1. Схема сердечно-сосудистого континуума
СД – сахарный диабет; АГ – артериальная гипертензия; ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка; ХСН – хроническая сердечная недостаточность.

В ней рассматривается последовательное развитие поражения сердца, начиная с факторов риска и заканчивая развитием сердечной недостаточности и фатального исхода. Как вы можете видеть, ремоделирование происходит почти в середине континуума и ему предшествует целый каскад событий на уровне метаболизма миокарда, нарушений процессов нейрогуморальной регуляции, апоптоза и электромеханической диссоциации.

Молекулярные механизмы ремоделирования сердца

Ремоделирование сердца является следствием сложной серии транскрипционных, сигнальных, структурных и функциональных событий на клеточном и тканевом уровнях, которые влияют на размер, массу, геометрию, функцию и электрическую активность сердца. Сначала эти реакции могут быть адаптивными, но если они сохраняются с течением времени, то приобретают черты патологических и вызывают дальнейшее повреждение миокарда по порочному кругу. В основе ремоделирования сердца лежат многие ключевые молекулярные пути и клеточные процессы, затрагивающие все компоненты сердечной ткани: кардиомиоциты (КМ), фибробласты, эндотелиальные и иммунные клетки. Молекулярные, клеточные и гистологические признаки ремоделирования могут различаться в зависимости от причины и тяжести повреждения сердца. Структурные изменения в сердце во многом определяются потерей КМ в результате некроза, некроптоза, апоптоза или аутофагии и фиброза, обусловленного пролиферацией фибробластов и реорганизацией внеклеточного матрикса (ВМ). При этом дисфункция митохондрий и метаболические нарушения способствуют развитию и прогрессированию ремоделирования сердца путем снижения его сократительной способности. Кроме того, микрососудистая эндотелиальная дисфункция ведет к увеличению выработки активных форм кислорода (АФК), способствует инфильтрации лейкоцитов и приводит к разрежению капилляров и гипоксии тканей. В дополнение к рекрутируемым иммунным клеткам резидентные макрофаги могут изменять свой профиль и взаимодействовать как с миоцитами, так и с немиоцитами, способствуя клеточным и молекулярным изменениям (рисунок 2).

Таким образом, существует сложная межклеточная взаимосвязь между различными типами клеток, присутствующими в миокарде, посредством цитокинов, факторов роста и некодирующих РНК.

Рисунок 2. Основные молекулярные механизмы, лежащие в основе ремоделирования сердца [70]

Метаболические нарушения

Изменения метаболизма миокарда напрямую взаимосвязаны с нарушениями функции сердца. Энергетический метаболизм сердца включает три основных компонента.

1. Утилизация субстрата – поглощение клетками в основном свободных жирных кислот и глюкозы, расщепление этих компонентов путем бета-окисления и гликолиза и вхождение образующихся промежуточных метаболитов в цикл Кребса.
2. Окислительное фосфорилирование – производство аденозинтрифосфата (АТФ) дыхательной цепью митохондрий.
3. Перенос и утилизация АТФ – передача энергии миофибриллам.

По сути, сократительная способность миокарда определяется этими процессами, лежащими в основе получения механической энергии. Синтез АТФ напрямую зависит от потребления миокардом кислорода. Митохондриальное окислительное фосфорилирование обеспечивает синтез 90% АТФ, что делает его основным источником энергии для сердца. Процесс

окислительного фосфорилирования определяется работой электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и АТФ-синтазы митохондрий. Образующиеся в реакциях катаболизма никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАДН2) передают атомы водорода ферментам дыхательной цепи. Электроны, двигаясь по ЭТЦ, теряют энергию, которая используется на выкачивание протонов Н+ из матрикса в межмембранное пространство. В конце ЭТЦ электроны, соединяясь с молекулами кислорода, восстанавливают его до воды. АТФ-синтаза использует энергию, созданную протонным электрохимическим градиентом, для фосфорилирования фденозиндифосфата (АДФ) в АТФ. На третьем этапе митохондриальная креатинкиназа катализирует перенос высокоэнергетической фосфатной связи в АТФ на креатин с образованием фосфокреатина и АТФ. Так как фосфокреатин – молекула меньшего размера, чем АТФ, он быстро диффундирует из митохондрий в миофибриллы, где миофибриллярная креатинкиназа катализирует преобразование АТФ из фосфокреатина. Свободный креатин, образующийся в результате удаления фосфата из фосфокреатина, диффундирует обратно в митохондрии [58].

Выбор энергетических субстратов в КМ имеет решающее значение для получения постоянного и максимального образования АТФ. В физиологических условиях митохондрии сохраняют динамическое и гомеостатическое состояние, регулируя метаболические пути и клеточные ионы, что закладывает основу для нормального функционирования клеток. Любое отклонение от этого гомеостатического состояния приводит к митохондриальной дисфункции, включая повышенный уровень митохондриального Ca2+, повреждение мембран и ферментов митохондрий и дефекты ЭТЦ, которые являются факторами, способствующими клеточному апоптозу и некрозу.

В здоровом сердце митохондриальное окисление жирных кислот является основным источником производства энергии, в то время как гликолиз играет второстепенную роль. В случае развития ишемии миокарда анаэробный гликолиз становится доминирующим источником производства энергии, в то время как митохондриальное окисление жирных кислот снижается, что приводит к продукции лактата и снижению внутриклеточного pH. Различные факторы, включая старение и ишемию миокарда, могут привести к нарушению метаболической гибкости, снижению способности окислять жирные кислоты и повышению зависимости от метаболизма глюкозы [82].

Поглощение глюкозы КМ опосредуется транспортерами глюкозы. Затем глюкоза фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата гексокиназой или преобразуется в сорбит полиольным путем. Глюкозо-6-фосфат впоследствии проходит через множество метаболических путей, включая гликолиз, пентозофосфатный путь (ПФП) и путь биосинтеза гексозамина. Гликолиз является важным путем метаболизма глюкозы в клетке, однако АТФ, образованный в результате гликолиза, составляет лишь небольшую часть общего пула АТФ в нормальном сердце. В цитозоле пируват может быть дополнительно использован для образования аланина аланинтрансаминазой или восстановлен до лактата лактатдегидрогеназой. С другой стороны, пируват окисляется пируватдегидрогеназой с образованием ацетил-КоА, участвующего в цикле трикарбоновых кислот в митохондриях.

При сердечной недостаточности активность митохондриальной креатинкиназы может снижаться до 20% от должной, а активность миофибриллярной креатинкиназы может снизиться до 50% по сравнению с нормальными значениями. Потери высокоэнергетических фосфатов и активности креатинкиназы вызывают серьезное снижение передачи АТФ, то есть уменьшение потока энергии внутри клетки, и, следовательно, сокращение доставки энергии к миофибриллам до 71%.

При повышенном потреблении АТФ АДФ стимулирует активность АТФ-синтазы, ускоряя поток электронов по ЭТЦ и тем самым окисляя НАДН и $ФАДН_2$. В то же время увеличение скорости и амплитуды переходных процессов цитозольного Ca2+ способствует поглощению Ca2+ митохондриями, где Ca2+ активирует цикл Кребса для превращения $НАД^+$ и ФАД в их восстановленные формы, соответственно. Кроме того, продукты цикла Кребса изоцитрат, малат и НАДН являются субстратами для ферментов, регенерирующих НАДФН, который, в свою очередь, реактивирует пероксиредоксин, глутатионпероксидазу и глутаредоксин – основные антиоксиданты. Таким образом, митохондриальный АДФ и Ca2+ играют взаимодополняющие роли в контроле дыхательной цепи, а поглощение митохондриями Ca2+ необходимо для восстановления антиоксидантной способности и предотвращения выброса митохондриальных АФК (рисунок 3).

Окислительный стресс

Окислительный стресс возникает, когда присутствие АФК превышает способность внутренних антиоксидантных систем справляться с этими свободными радикалами [53]. АФК включают различные химические молекулы, такие как супероксид, перекись водорода и гидроксильный радикал [77]. Избыточная продукция АФК играет значительную роль в развитии ремоделирования миокарда из-за прямого действия АФК на окисление ДНК, белков и липидных мембран. В дополнение, АФК активируют различные пути передачи сигнала, участвующие в индукции пролиферации фибробластов, активации металлопротеиназ, индукции апоптоза, активации сигнальных путей гипертрофии и трансформации белков, транспортирующих кальций [17].

Сигнальный путь NO – растворимая гуанилатциклаза – циклический гуанозинмонофосфат

Как уже говорилась ранее, повышение активации НАДФ/НАДФН-оксидазы и ксантиноксидазы вызывает увеличение синтеза АФК, снижение активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и уменьшение биодоступности оксида азота (NO). Сигнальный путь, связанный с NO, представляет собой один из наиболее важных регуляторов функции сердца и сосудов. Влияние NO реализуется путем связывания с растворимой гуанилатциклазой (рГЦ), которая служит внутриклеточным рецептором NO и ферментом, катализирующим превращение гуанозинтрифосфата в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Действие цГМФ в отношении предотвращения ремоделировании миокарда определяется как гемодинамическими эффектами – снижением

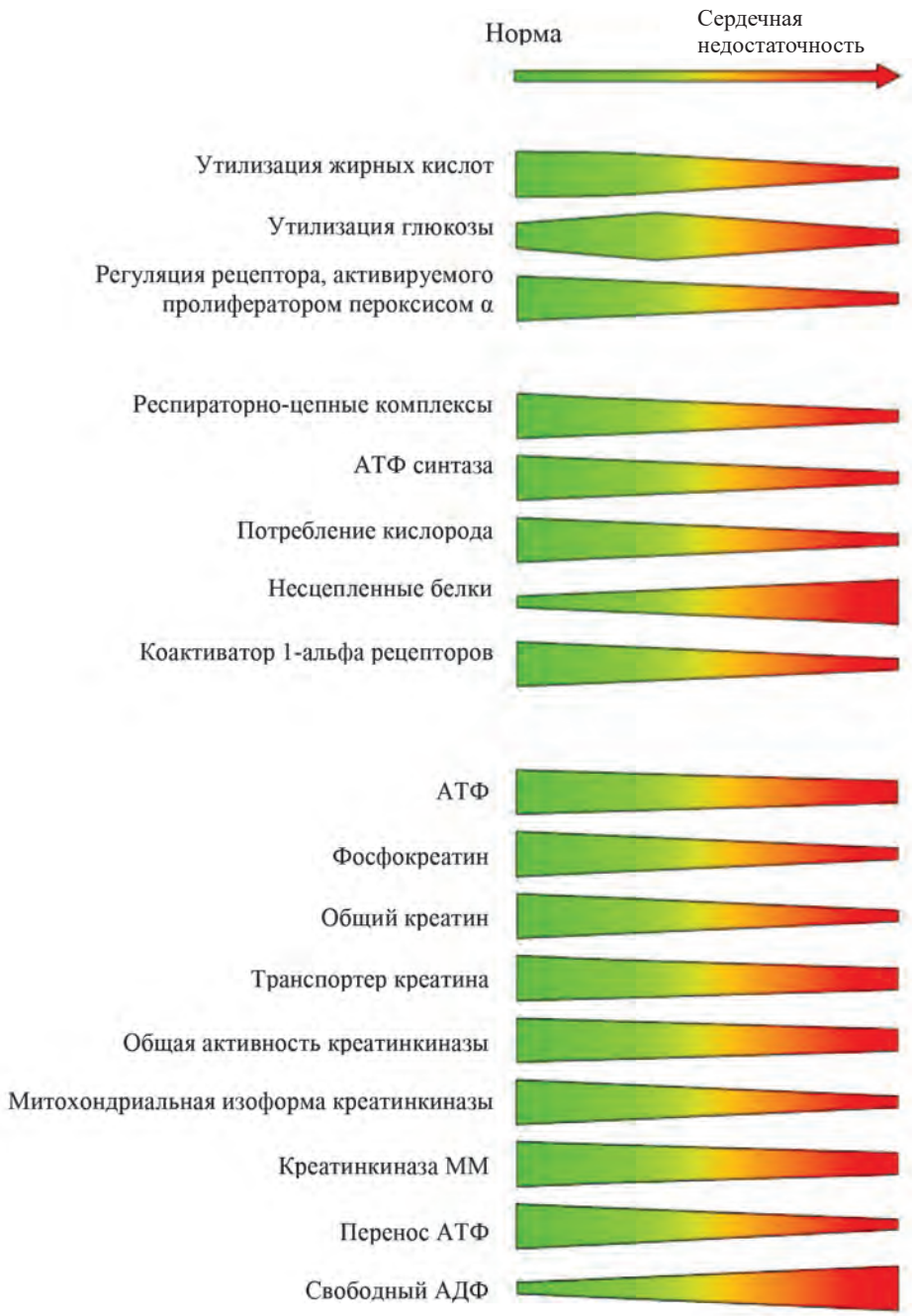

Рисунок 3. Изменения сердечного энергетического обмена при сердечной недостаточности [51]
АДФ – аденозиндифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат.

пред- и постнагрузки на сердце в результате прогрессирования вазодилатации, так и воздействием цГМФ на **протеинкиназу G (ПКG),** которая фосфорилирует определенные белки, приводя к уменьшению гипертрофии и апоптоза. Растяжимость миокарда и пассивная жесткость определяются соединительным филаментом саркомера, основу которого представляет титин. Титин является одним из структурных микрофиламентов саркомера, основная функция которого – обеспечение ретракции миозиновых фибрилл относительно актиновых филаментов во время расслабления миоцитов [7]. В ряде исследований было показано, что нарушение функции титина приводит к увеличению пассивного напряжения кардимиоцитов и, как следствие, повышению их жесткости [38, 84, 95]. цГМФ-активированная ПКG снижает жесткость посредством фосфорилирования остатка серина (S469) в N2-BUS титина, тем самым улучшая диастолическую функцию сердца [72].

Помимо того, что окислительный стресс играет важную роль в процессах гипертрофии КМ, снижение активности сигнального пути NO-рГЦ-цГМФ приводит к активации процессов аутофагии, апоптоза или некроза с дальнейшим отложением коллагена и замедлением его деградации в миокарде. Появление участков фиброза ведет к формированию эксцентрического ремоделирования ЛЖ.

Натрийуретические пептиды

Еще одним ферментом, участвующим в образовании цГМФ, является мембранно-связанная гуанилатциклаза (мГЦ). Данный сигнальный путь активируется при воздействии натрийуретических пептидов (НУП) А- и В-типов (ANP, BNP). НУП синтезируются КМ в виде активного гормона ANP и прогормона BNP. В кровотоке гликозилированный proBNP постепенно дегликозилируется и далее обрабатывается конвертазами proNP, корином или фурином, в неактивный NT-proBNP1-76 и активный BNP1-32. НУП проявляют свое действие через взаимодействие с рецепторами на клеточной поверхности. На сегодняшний день идентифицировано 3 рецептора, и их можно разделить на 2 основных класса: связанные с гуанилатциклазой рецепторы А и В (NPRA и NPRB) и рецептор клиренса натрийуретического пептида (NPRC). Активация NPRA и NPRB вызывает повышение уровня внутриклеточного цГМФ и активацию его ключевой эффекторной молекулы, ПКG, которая оказывает кардиопротективное действие [42]. NPRC, с другой стороны, не имеет внутриклеточного домена гуанилатциклазы и, как было показано, передает сигнал ингибирующему гуанин-нуклеотид-связывающему белку (ингибиторному G-белку). ANP и BNP, в первую очередь, связываются и передают сигнал через NPRA, тогда как CNP связывается с NPRB, а клиренс-рецептор, NPRC, связывает все НУП. Было показано, что в миокарде все три рецептора NP экспрессируются как в КМ, так и в сердечных фибробластах. Стимуляция NPRA с помощью ANP или BNP вызывает повышение уровня цГМФ в КМ, тогда как стимуляция NPRB с помощью CNP не имеет этого эффекта. В сердечных фибробластах стимуляция как ANP, так и CNP приводит к повышению уровней цГМФ, что позволяет предположить, что и NPRA, и NPRB являются функциональными [36].

Роль АФК в патогенезе ремоделирования миокарда определяется и другими эффектами. Они также могут связываться с NO, тем самым образуя пероксинитрит (ONOO), что ассоциировано с усугублением оксидативного стресса. В норме в условиях in vivo функционирует некая защита – антиоксидантная система, представленная ферментами, которые разлагают АФК на воду и кислород, но при наличии сопутствующих заболеваний, создающих фон низкоуровневого воспаления, активность ферментов данной системы по сравнению с ферментами, продуцирующими АФК, снижена [49].

Иммунное воспаление

Повреждение миокарда в результате проникновения патогенов или внешнего воздействия, такого как ишемия или гемодинамическая перегрузка, приводит к активации врожденной и адаптивной иммунных систем в сердце. В то время как врожденная иммунная система обеспечивает глобальную, неспецифическую защиту от патогенов или повреждения тканей, адаптивная иммунная система обеспечивает высокоспецифичный ответ, опосредуемый В-клетками и Т-клетками. В ответ на повреждение миокарда воспалительная реакция, индуцируемая врожденной иммунной системой, обеспечивает сердцу кратковременную адаптацию к повышенному стрессу (физиологическое воспаление). Однако эта воспалительная реакция может стать нерегулируемой и привести к хроническому воспалению и, как следствие, дисфункции и ремоделированию миокарда. Врожденная иммунная система активируется трансмембранными и цитозольными рецепторами, распознающими молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном, паттерны эндогенного материала, выделяемого поврежденными клетками, и молекулярные паттерны, ассоциированные с микроорганизмами [41, 44]. Эти рецепторы, называемые рецепторами распознавания образов, экспрессируются клетками, находящимися в сердце, включая КМ, ЭК и резидентные в тканях иммунные клетки. Активация рецепторов распознавания образов активирует нижестоящие сигнальные каскады, регулирующие экспрессию генов, которые кодируют провоспалительные цитокины и хемокины. Наиболее важные рецепторы распознавания образов в сердце включают Toll-подобные рецепторы, RIG-I-подобные рецепторы (индуцируемые ретиноевой кислотой), NOD-подобные рецепторы, инфламмасому NLRP3 и рецепторы лектина С-типа [24, 44, 80].

Классический иммунный ответ на повреждение тканей включает в себя несколько фаз. Начальная острая фаза характеризуется повышенной выработкой провоспалительных цитокинов и хемокинов, сопровождающейся быстрым притоком нейтрофилов и моноцитов из кровотока к месту повреждения миокарда. Фаза пролиферации характеризуется фагоцитарным удалением некротических клеток макрофагами, притоком Т-клеток (включая Т-хелперные клетки и регуляторные Т-клетки) и В-клеток, активацией миофибробластов, продуцирующих коллаген, и выработкой противовоспалительных медиаторов (липоксины, трансформирующий фактор роста-β (ТФР-β) и интерлейкин (ИЛ)-10). Последняя фаза характеризуется образованием рубца и дезактивацией и/или гибелью репаративных клеток, что приводит к ремоделированию ЛЖ [62, 74] (рисунок 4).

Хроническое низкоуровневое воспаление

Несколько потенциальных механизмов могут объяснить хроническое воспаление миокарда при сердечной недостаточности. Это может быть сохраняющееся повреждение миокарда, сопровождаемое вышеописанными изменениями, или же активация классических нейрогормональных систем. Причем активация симпатической нервной системы и ренин-ангиотензин–альдостероновой системы (РААС) служит независимым от повреждения ткани механизмом гибели КМ и активации макрофагов, Т-клеток и В-клеток [5, 43, 45].

Роль иммунных клеток

КМ считается паренхиматозной клеткой сердца, определяющей его функцию, в то же время немиоциты – иммунные клетки, фибробласты и ЭК, представленные в большом количестве в здоровом сердце, вносят существенный вклад в его сократительную способность [60]. Влияние немиоцитов на сократительную функцию сердца обусловлено секрецией паракринных факторов, регуляцией ВМ и продукцией NO [29, 31, 83]. Учитывая, что подавляющее большинство массы и объема сердца состоит из КМ, оценка общего сердечного метаболизма отражает главным образом метаболизм миоцитов [75]. Однако недавно было обнаружено, что решающее значение как для поддержания нормальной функции сердца, так и при ее нарушениях могут иметь изменения метаболических путей немиоцитарных клеток [48].

Иммунные клетки в здоровом и поврежденном сердце

Иммунные клетки, которые в основном представлены макрофагами, составляют до 10% немиоцитов в сердце [60]. В широком смысле макрофаги могут быть поляризованы в сторону провоспалительного (М1) фенотипа, который секретирует провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) и ИЛ-1β, или противовоспалительный (М2) фенотип.

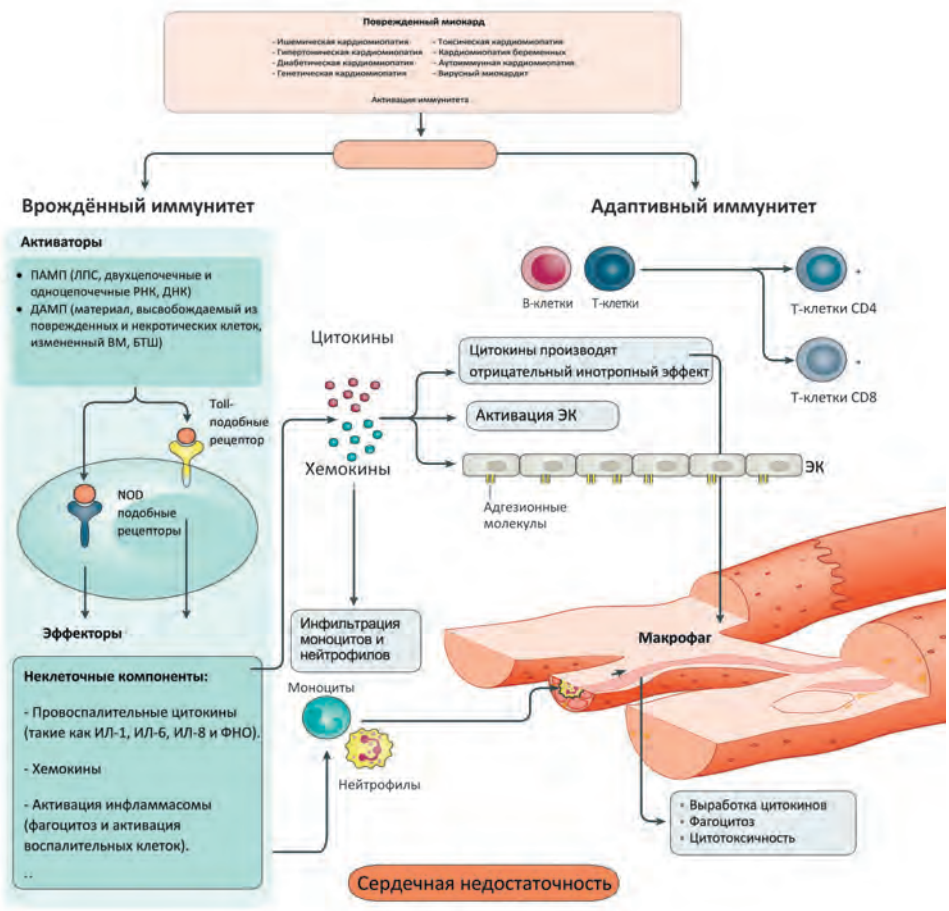

Рисунок 4. Врожденная и адаптивная иммунные системы при сердечных заболеваниях [1]. БТШ – белок теплового шока; ДАМП – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями; ЛПС – липополисахариды; ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; ФНО – фактор некроза опухоли; ЭК – эндотелиальные клетки; ИЛ – интерлейкин; ВМ – внеклеточный матрикс.

Сердечные макрофаги играют вспомогательную роль в поддержании сердечного гомеостаза и обеспечивают защиту от патогенов. Во время повреждения сердца, такого как инфаркт миокарда (ИМ), макрофаги замещаются инфильтрирующими моноцитами, которые инициируют воспалительную реакцию с участием нейтрофилов, помогающих фагоцитировать некротические клеточные остатки. Этот воспалительный ответ на ишемическое повреждение развивается быстро, так как большое количество циркулирующих моноцитов проникает в сердце в течение 30 минут после ишемического повреждения. При старении и повреждениях, вызванных перегрузкой давлением, резидентные макрофаги постепенно заменяются моноцитами крови,

и воспалительная реакция обычно протекает медленнее [40, 57]. По мере прогрессирования повреждения макрофаги смещаются в сторону фенотипа М2 и способствуют разрешению воспаления и образованию рубцов [40].

Роль метаболизма иммунных клеток при ремоделировании сердца

Для поддержания провоспалительных функций метаболизм макрофагов и нейтрофилов М1 основывается на гликолизе, обуславливающем повышенную активность ПФП, необходимого для образования НАДФ, используемого в синтезе провоспалительных липидных медиаторов. Повышение регуляции гликолиза и ПФП в макрофагах М1 отражает снижение активности и укорочение цикла трикарбоновых кислот, что приводит к накоплению сукцината и стабилизации гипоксически-индуцируемого фактора-1α, который способствует провоспалительным и гликолитическим процессам. Наоборот, макрофаги М2 зависят от окислительного фосфорилирования, полностью интактного цикла ТКА и подавления гликолиза и ПФП [90]. Макрофаги М2 также катаболизируют глютамин, чтобы способствовать накоплению α-кетоглутарата, который эпигенетически подавляет передачу сигналов энхансера легкой цепи ядерного фактора активированных В-клеток (NF-κB), одного из основных провоспалительноых сигнальных путей [38].

Роль провоспалительных цитокинов

В экспериментальных исследованиях как на изолированных сокращающихся КМ in vitro, так и in vivo на животных моделях было показано, что ФНО, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-18 оказывают отрицательное инотропное действие [27, 81, 87]. Исследования на трансгенных мышах с кардиоспецифической сверхэкспрессией ФНО продемонстрировали, что у этих мышей развивается прогрессирующая дилатация ЛЖ и что ФНО индуцирует активацию матриксных металлопротеиназ (ММП), которые разрушают внеклеточный коллагеновый матрикс, тем самым способствуя дилатации ЛЖ. Эти исследования также продемонстрировали, что длительное воспаление приводит к изменениям баланса между активностью ММП и тканевыми ингибиторами ММП (ТИМП), с увеличением соотношения ММП к ТИМП вначале (что способствует деградации ВМ) 35 и снижением соотношения на фоне длительной воспалительной реакции, сопровождающееся увеличением, опосредованной тучными клетками, передачи сигналов ТФР-β (что способствует прогрессирующему фиброзу миокарда) [91].

Фиброз: фибробласты и внеклеточный матрикс

Фиброз сердца является важным патофизиологическим компонентом, определяющим систолическую и диастолическую дисфункцию миокарда и аритмогенез. Поскольку сердце взрослого человека обладает незначительной регенеративной способностью, гибель большого количества КМ при инфаркте миокарда приводит к репаративному фиброзу, который имеет решающее значение для сохранения структурной целостности желудочка. С другой

стороны, патофизиологические стимулы, такие как перегрузка давлением, перегрузка объемом, метаболическая дисфункция и старение, могут вызывать интерстициальный и периваскулярный фиброз (рисунок 5).

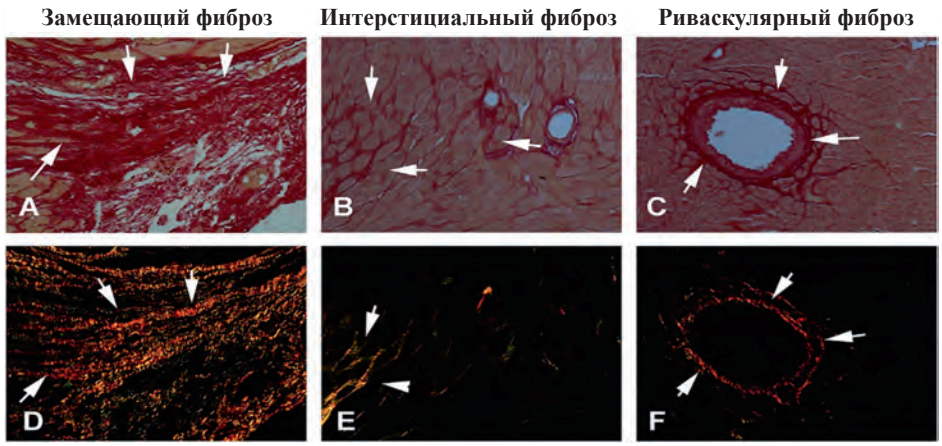

Рисунок 5. Гистопатологические типы фиброза сердца [22]

Изображения показывают окрашенный в красный цвет срез sirius на мышиных моделях инфаркта миокарда (1 час ишемии/28 дней реперфузии –A, D) и перегрузки давлением в левом желудочке, вызванной поперечным сужением аорты (28 дней перегрузки давлением – B-C, E-F). Срезы визуализируются при световой микроскопии (A–C)

Миокард желудочков состоит из слоев тесно связанных КМ и интерстиция, который определяется сложной сетью белков ВМ. ВМ преимущественно представлен фибриллярными коллагенами и служит не только каркасом для клеточных элементов, но также важен для передачи сократительной силы. В норме коллагены I и III типов являются основными представителями коллагенов в сердце, отвечающими за прочность и растяжимость миокарда. Коллаген I и III типов синтезируется из проколлагеновых предшественников, содержащих С-терминальный пропептид из проколлагена I типа (PICP) и N-терминальный пропептид из проколлагена III типа (PIIINP). ВМ сердца также содержит гликозаминогликаны, гликопротеины, протеогликаны и протеазы, которые могут активироваться при повреждении, вызывая репаративный ответ. С морфологической точки зрения ВМ сердца можно подразделить на эпимизиальную, перимизиальную и эндомизиальную составляющие. Эпимизий расположен на эндокардиальной и эпикардиальной поверхностях и обеспечивает поддержку эндотелиальных и мезотелиальных клеток. Сердечные фибробласты ВМ могут играть важную роль в сохранении структурной целостности матриксной сети, регулируя оборот коллагена, что требует постоянного синтеза и деградации белков ВМ [22].

Активация фибробластов

В условиях патологического стресса фибробласты пролиферируют и дифференцируются в миофибробласты, которые секретируют большое количество структурных (например, коллагенов и фибронектина) и матриклеточных

белков, а также ферментов, факторов роста, цитокинов и некодирующих РНК. Это приводит к интенсивному отложению коллагеновых волокон и последующему фиброзу миокарда. Несколько других типов клеток, включая КМ, ЭК, перициты, макрофаги, лимфоциты и тучные клетки, могут способствовать фиброобразованию, продуцируя протеазы, участвующие в метаболизме матрикса, секретируя фиброгенные медиаторы или оказывая контактнозависимое действие на фенотип фибробластов. Механизмы индукции фибробластов зависят от типа первичного повреждения миокарда. Активация нейрогуморальных путей стимулирует фибробласты как напрямую, так и через популяцию иммунных клеток. Также в регуляции фиброза принимают участие цитокины и факторы роста, такие как фактор некроза опухоли-α, ИЛ-1, ИЛ-10, хемокины, члены семейства ТФР-β, ИЛ-11 и тромбоцитарные факторы роста [22].

Фиброз миокарда является результатом превышения процессов синтеза коллагена над деградацией, что приводит к чрезмерному образованию и отложению коллагеновых волокон с преобладанием коллагеновых волокон I типа над волокнами III типа.

В процессе образования и созревания коллагеновых волокон есть две ключевые стадии:

1) высвобождение карбокси- и аминоконцевых пропептидов из проколлагена с образованием молекул коллагена, способных образовывать фибриллы;

2) стабилизация коллагеновых фибрилл посредством поперечных связей (в основном ферментативно опосредуется ферментами семейства лизилоксидаз (LOX), включая LOX и LOX-like2). Повышенная сшивка коллагена делает волокна более жесткими и устойчивыми к деградации, способствуя жесткости миокарда с последующим нарушением его функции.

Деградация коллагена регулируется матриксными протеиназами (ММП) и их специфическими тканевыми ингибиторами. Известно, ММП, в том числе ММП-2, ММП-9 и плазмин, участвуют в активации ТФР-β, а также матрицеллюлярного белка тромбоспондина 1. ТФР-β принимает участие в патогенезе фиброза сердца посредством SMAD-опосредованных сигнальных путей. ТФР-β связывается с конститутивно активным рецептором 2 типа на клеточной поверхности, который присоединяет и фосфорилирует рецептор первого типа, а затем подключается к SMAD. Активация SMAD 2/3 влияет на экспрессию профибротических генов, которые являются важнейшим компонентами формирующейся фиброзной ткани: коллагены, протеогликаны, интегрины, факторы роста соединительной ткани и ММП [65].

Помимо факторов роста, в активацию рецепторов на поверхности фибробластов и трансдукцию внутриклеточных сигнальных каскадов, которые приводят к транскрипции генов ВМ и модуляции белков, связанных с ремоделированием матрикса, вовлечены нейрогуморальные пути, воспалительные цитокины и матриклеточные макромолекулы.

Нейрогуморальная активация

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система

Фактически ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) ответственна за многие патофизиологические изменения, которые происходят

при ремоделировании сердца. Повышенный уровень ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) приводит к увеличению содержания циркулирующего ангиотензина-II (АТ-II), который является хорошо известным профиброгическим медиатором. Действуя через рецептор АТ- II 1 типа (АТ1), АТ-II стимулирует экспрессию ТФР- β как через SMAD-зависимые, так и через SMAD-независимые пути. Однако ТФР-β не является единственным молекулярным медиатором эффектов, индуцированных РААС. Рецептор АТ1, стимулируемый АТ-II, приводит также к активации протеинкиназы С [56, 67], которая, в свою очередь, активирует митоген-активируемую протеинкиназу (МАРК). Известны 3 сигнальных пути МАРК, приводящие к перестройке ВМ и прогрессированию ремоделирования: p38, c-Jun-концевые киназы (JNK) и ERK 1/2 [55, 63]. JNK и p38 вместе с активированным рецептором альдостерона индуцируют отложение фибробластного матрикса, влияют на изменение соотношения ММП и ТИМП. Также было показано, что АТ II увеличивает процент и скорость укорочения миоцитов, увеличивает скорость повторного удлинения миоцитов и увеличивает пиковые систолические переходные уровни кальция (рисунок 6) [94].

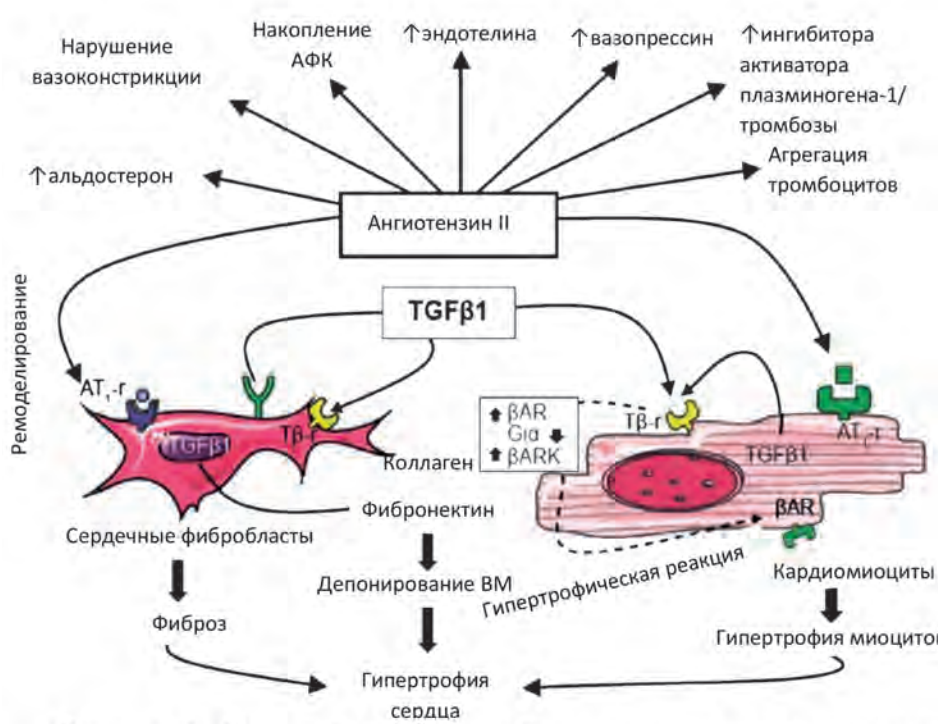

Рисунок 6. Роль нейрогуморальной регуляции в ремоделировании сердца [18]
AT1-r – рецептор ангиотензина II типа 1; βAR – β-адренергический рецептор; βARK – β-адренергическая рецепторная киназа; TGFβ1 – трансформирующий фактор роста β1; Tβ-r – рецептор трансформирующего фактора роста β

Дисфункция эндотелия: эндотелиоциты

Дисфункция эндотелия представляет собой активацию эндотелия, сопровождающуюся провоспалительным, пролиферативным и прокоагулянтным эффектами, снижением биодоступности вазодилататоров, в частности NO, и увеличением концентрации вазоконстрикторов.

В сердце взрослого человека капилляры плотно распределены по всему миокарду, при этом количество эндотелиальных клеток (ЭК) примерно в 3 раза выше, чем КМ. Капиллярные и эндокардиальные ЭК находятся в непосредственной близости от КМ и обеспечивают множественные аутокринные и паракринные сигналы, контролирующие функцию сердца (рисунок 2). ЭК продуцируют различные факторы, контролирующие сократительную способность КМ. Основным фактором является NO. Также ЭК синтезируют эндотелин-1, мощный вазоактивный пептид, который может связываться с рецепторами эндотелина B, экспрессируемыми ЭК, либо рецепторами эндотелина A, экспрессируемыми гладкомышечными клетками и КМ. Активация рецепторов эндотелина B стимулирует высвобождение оксида азота и простаноидов, а также предотвращает апоптоз [52]. Напротив, стимулированные рецепторы эндотелина A индуцируют сокращение клеток за счет увеличения внутриклеточного кальция как в гладкомышечных клетках, так и в КМ [64]. Помимо производства небольших молекул и пептидов, ЭК также секретируют многочисленные белки, включая факторы роста и матриклеточные белки, способные оказывать влияние на структуру и функцию КМ (рисунок 7) [23].

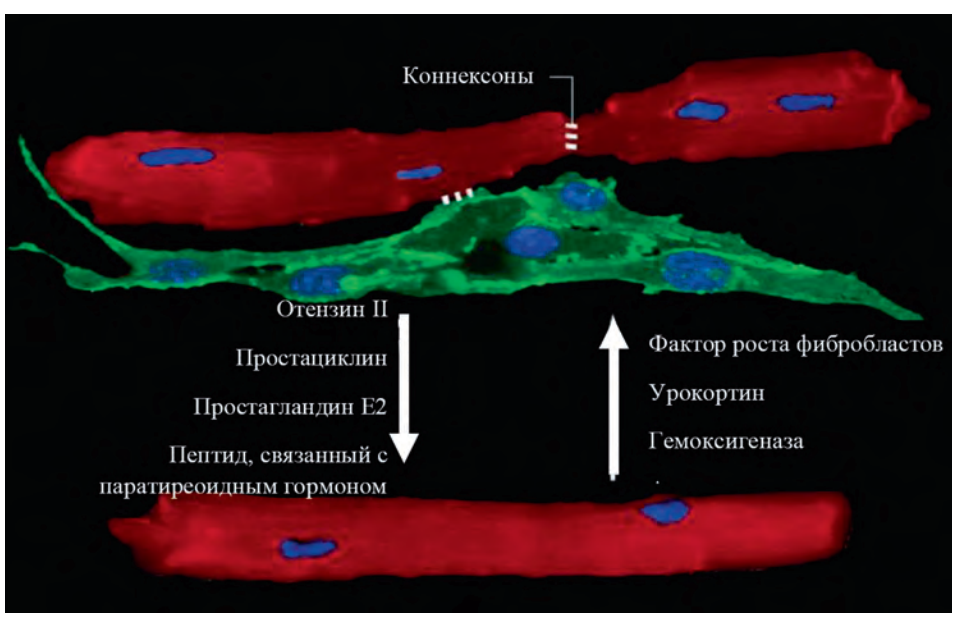

Рисунок 7. Связь между эндотелиальными клетками и кардиомиоцитами

Роль эндотелиоцитов в ремоделировании

В случае развития физиологической гипертрофии миокарда увеличение площади КМ сопровождается усилением ангиогенеза. Напротив, патологическая гипертрофия необратима и обычно связана с потерей миоцитов, фиброзом и снижением плотности капилляров. КМ, проходящие первую фазу компенсаторной гипертрофии, продуцируют проангиогенные факторы (VEGF) [88, 92], способные стимулировать рост кровеносных сосудов. С другой стороны, усиление коронарного ангиогенеза может быть достигнуто путем специфической для сердца сверхэкспрессии ангиогенных факторов, приводящей к гипертрофии сердца в отсутствие какой-либо дополнительной прогипертрофической стимуляции [79]. Точный механизм, с помощью которого повышенный ангиогенез вызывает гипертрофию КМ, еще предстоит полностью выяснить.

Как упоминалось ранее, NO, секретируемый ЭК, стимулирует выработку цГМФ. Повышенные уровни цГМФ активируют ПКG, которая является ингибитором прогипертрофического транскрипционного регулятора ядерного фактора активированных Т-клеток. Системное провоспалительное состояние приводит к метаболическому сдвигу и продукции АФК эндотелиоцитами. Это, в свою очередь, снижает доступность NO, что сопровождается снижением уровня цГМФ и нарушением активности ПКG [19]. Эта ось является ключевой в развитии СН с сохраненной фракцией выброса.

Другим важным регулятором гипертрофии сердца служит эндотелин-1. При перегрузке давлением повышается выработка эндотелина-1, что сопровождается усилением вазоконстрикции и нарушением функции эндотелиального NO. Это приводит к окислительному стрессу и гибели КМ [85]. Кроме того, эндотелин-1 активируется посредством АТ-II, участвующего в мобилизации внутриклеточного кальция и активации протеинкиназы С [16].

В это же время Е-селектин участвует в адгезии лейкоцитов к сосудистой стенке и способствует миграции моноцитов в субэндотелиальное пространство, где синтезируется ТФРβ. Последний стимулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, способствует отложению коллагена в интерстициальном пространстве. В результате повышаются диастолическое напряжение покоя КМ и жесткость миокарда, приводящие к развитию диастолической дисфункции.

Кроме того, в условиях гипоксии клетки эндотелия начинают синтезировать АПФ, запускающий цепь реакций, конечным результатом которых является активация ренин-ангиотензиновой системы и повышение уровня АТ-II.

Гипертрофический рост кардиомиоцитов

Одним из ключевых принципов биологии считается представление о том, что большинство взрослых КМ являются терминально дифференцированными клетками и, следовательно, не пролиферируют. Скорее, они реагируют на стресс ростом или гибелью. Однако недавно было показано, что часть клеток ЛЖ на самом деле способна повторно вступать в клеточный цикл и размножаться [6, 35, 61, 71]. Тем не менее большинство доказательств

указывает на то, что основная часть КМ неспособна к делению и реагирует на стресс, вызывая ответ гипертрофического роста. В рамках этого процесса происходит широкий спектр транскрипционных и посттрансляционных событий, включая активацию паттерна экспрессии генов, напоминающего тот, который наблюдается во время развития плода (программа фетальных генов).

Помимо механической нагрузки, КМ реагируют на ряд других сигналов роста, включая цитокины, факторы роста, катехоламины, вазоактивные пептиды и гормоны. Некоторые данные указывают на то, что размер клеток и организация саркомеров регулируются различными путями [3].

В зависимости от целевого рецептора гуморальные стимулы можно разделить на 2 основные группы:

- с участием факторов роста, таких как инсулиноподобный фактор роста-1 и ТФР-β, которые действуют на рецепторы, связанные с тирозинкиназой, и отвечают за адаптивную (физиологическую) гипертрофию;
- с участием молекул, активирующих рецепторы, связанные с G-белком, таких как катехоламины, АТ-II и эндотелин-1, ассоциированных с прогрессированием сердечной недостаточности [32, 47].

Это убедительно свидетельствует о том, при физиологической и патологической гипертрофии задействованы разные сигнальные пути, о которых говорилось ранее (рисунок 8) [9].

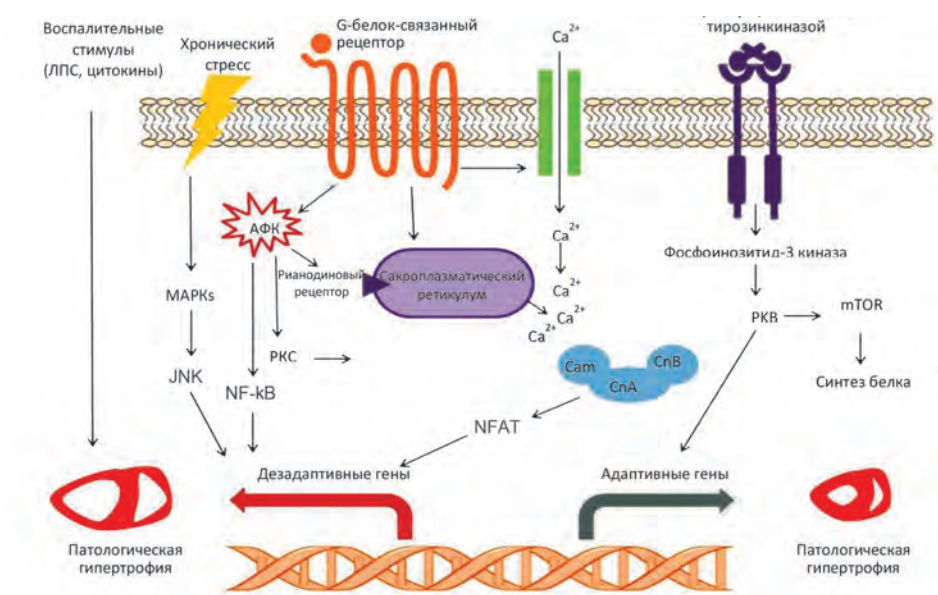

Рисунок 8. Молекулярные основы гипертрофии миокарда [69]
ЛПС – липополисахариды; АФК – активные формы кислорода; PKC – протеинкиназа C; PKB – протеинкиназа B; Cam – кальмодулин; CnA – кальциневрин A; CnB – кальциневрин B; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; MAPK – митоген-активные пирозинкиназы; JNK – c-Jun N-концевая киназа; NF-kB – ядерный фактор каппа B; NFAT – ядерный фактор активированных T-клеток

Гибель кардиомиоцитов: аутофагия, апоптоз и некроз

Гибель КМ является фундаментальным процессом как при физиологических, так и при патологических состояниях, процесс контролируется несколькими сигнальными путями, включая апоптоз, некроптоз и аутофагию. Как только происходит потеря КМ, оставшиеся КМ подвергаются повышенному давлению и/или объемной нагрузке и становятся гипертрофированными [89]. Этот компенсаторный ответ может стать неадаптивным в долгосрочной перспективе, приводя к гибели оставшихся КМ. В условиях ишемии или перегрузки давлением процесс апоптоза может запускаться при участии цитокинов и повышения АФК [30, 59].

Аутофагия – механизм клеточного гомеостаза, при котором макромолекулярные компоненты белка и митохондрий расщепляются и в дальнейшем используются для производства энергии, синтеза необходимого белка и биогенеза органелл. Регуляция аутофагии зависит как от внутренних, так и от внешних стимулов, включая сигналы воспаления, такие как ФНОα, который запускает путь NF-κB, и молекулярный фрагмент, связанный с повреждением. Аутофагия представляет собой механизм, позволяющий сердцу адаптироваться в ответ на стрессовые условия, такие как недостаток питательных веществ, окислительный стресс [20] и гипоксия. Однако длительное состояние высокой активации аутофагии может привести к необратимым изменениям [93]. Исследования роли аутофагии при сердечно-сосудистых заболеваниях доказали, что интенсивность, продолжительность и условная активация аутофагии являются ключевыми детерминантами реакции сердца на патогенные воздействия. Было показано, что сигнальный путь мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), представляет собой основной молекулярный механизм подавления аутофагии [78].

Некроптоз – одна из форм гибели клеток, которая по всем своим морфологическим характеристикам напоминает классический некротический процесс, но в отличие от последнего является генетически контролируемым. Несмотря на схожесть с некрозом, некроптоз происходит в физиологических условиях и направлен на поддержание и сохранение клеточной популяции.

Пироптоз – вид программируемой гибели клетки, при котором в результате активации каспазы 1 происходит нарушение целостности плазматической мембраны и быстрое высвобождение содержимого клетки. Этот процесс, с одной стороны, позволяет эффективно предотвращать чрезмерную пролиферацию клеток, с другой стороны, чрезмерный пироптоз может приводить к фиброзу сердца, гипертрофии миокарда, гибели КМ и, как следствие, к ремоделированию сердца. Наиболее существенное отличие пироптоза от других способов гибели клеток заключается в быстром разрыве плазматической мембраны, экспансии клеток, растворении и разрыве клеточной мембраны, высвобождении клеточного содержимого и большого количества воспалительных факторов, таких как ИЛ-1β и ИЛ-18, рекрутирующих воспалительные клетки и вызывающих воспалительные реакции [33, 34, 86]. В настоящее время многие исследования доказали, что пироптоз может быть эндогенным регуляторным фактором сердечно-сосудистых заболеваний и играть важную роль в развитии ремоделирования [11].

Изменение глобальной структуры и функции сердца

С точки зрения кардиомеханики, ремоделирование левого желудочка проявляется в изменении его формы от эллипсоида вращения, с соотношением длинного размера камеры к короткому 2 х 1, к более сферической форме, когда размеры желудочка практически сравниваются. В результате этого по закону Лапласа возрастает напряжение стенки желудочка, которое прямо пропорционально произведению давления в полости на радиус и обратно пропорционально толщине стенки желудочка. При этом, как описывалось выше, нарушается биоэнергетика миокарда, развивается асинхронное сокращение волокон миокарда, и, как следствие, повышается потребление миокардом кислорода [14, 66, 68]. Изменение формы желудочка приводит к растяжению папиллярных мышц, что в свою очередь обуславливает появление относительной митральной регургитации, которая ведет к еще большему снижению сердечного выброса [37]. Более того, повышение конечного диастолического объема левого желудочка и давления в его полости вызывает субэндокардиальную ишемию миокарда, которая усугубляет дисфункцию желудочка, снижает толерантность к физической нагрузке и повышает риск развития жизненно угрожающих желудочковых аритмий (рисунок 9) [12, 21, 37].

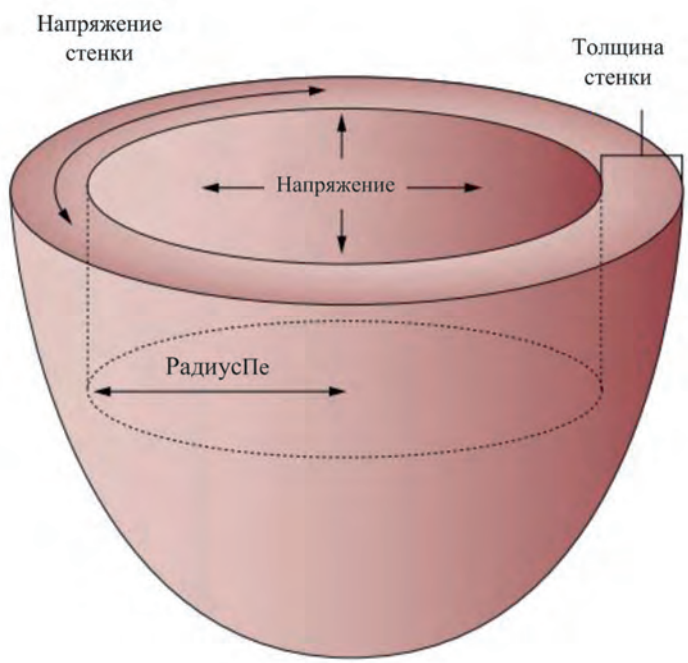

Рисунок 9. Напряжение стенки при ремоделировании левого желудочка
PxR/2H, где T – напряжение стенки, P – давление в полости, R – радиус желудочка, H – толщина стенки желудочка.

Нарушение диастолической функции сердца

Важнейшим компонентом ремоделирования сердца является развитие его дисфункции и, как следствие, при продолжении действия перегрузки – сердечной недостаточности. Процесс может касаться как систолы, так и диастолы сердца либо затрагивать оба компонента сердечного цикла. Но по данным большинства авторов [8, 46, 73], даже при систоло-диастолической декомпенсации, нарушения расслабления миокарда предшествуют нарушениям сокращения желудочка.

Так, у пациентов с изолированной диастолической сердечной недостаточностью, например при артериальной гипертонии, повышение конечного диастолического давления происходит при нормальных размерах камер сердца, что приводит к смещению кривой давление – объем влево. Если конечное диастолическое давление существенно повышено, то это приводит к появлению клинических симптомов при минимальной физической нагрузке или даже в покое. Проведенное лечение может сместить кривую давление – объем вправо, но она все равно будет аномальной из-за существующей гипертрофии миокарда (рисунок 10). Кроме того, следует учитывать, что процесс расслабления миокарда является активным и во многом зависит от энергозависимого процесса связей актина и миозина КМ, что происходит при участии ионов Ca2+. Нарушение его гомеостаза за счет изменения выхода из цитозоля, энергозависимого обратного выхода кальция из саркоплазматического ретикулума или нарушения фосфорилирования фосфоламбана и кальмодулина приводит к повышению концентрации кальция в цитозоле в период диастолы, нарушению расслабления миокарда и повышению его пассивной жесткости [2, 28, 96, 97].

Рисунок 10. Динамика кривой давление – объем при диастолической сердечной недостаточности
ЛЖ – левый желудочек; ФК – функциональный класс; NYHA – Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация

Большое внимание при изучении диастолической дисфункции, да и функции сердца в целом, уделяется левому предсердию [54]. Оно во многом определяет наполнение левого желудочка, во время систолы левого предсердия поступает примерно половина сердечного выброса, его функция является хорошим индикатором успешного лечения фибрилляции предсердий и сердечной недостаточности в целом. Очень важно, что нарушение его функции может быть ранним индикатором диастолической дисфункции сердца [25, 50]. Следует отметить, что появившиеся за последнее время ультразвуковые методы оценки функции левого предсердия – изучение продольного напряжения и трансмитрального потока (рисунок 11) – позволяют изучить ремоделирование предсердия, а также неинвазивно оценить выраженность фиброза стенки и измерить давление в его полости [4, 10, 76]

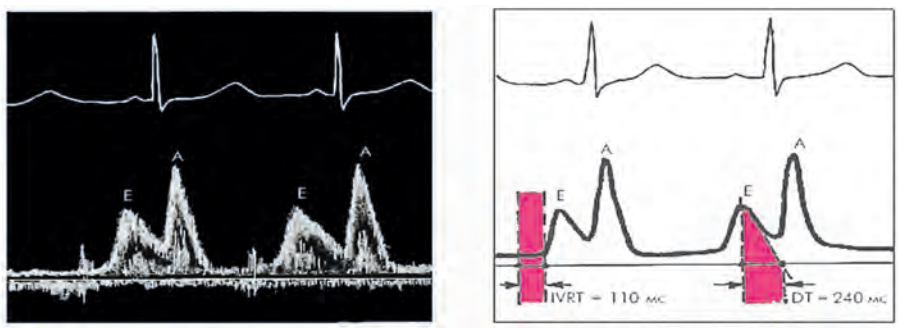

Рисунок 11. Трансмитральный поток при диастолической сердечной недостаточности

Отношение пиковых скоростей волн Е/А. Е – быстрый митральный поток крови, пассивно стекающей из легочных вен через открытое в диастоле отверстие митрального клапана в ЛЖ, А – скорость кровотока при сокращении левого предсердия.

Заключение

Ремоделирование сердца, как и сам сердечно-сосудистый континуум, не являются процессами, развивающимися с неотвратимой постоянной скоростью (рисунок 12) [26]. Если заболевание, приводящее в финале к сердечной недостаточности, может развиваться многими годами, то с появлением клинических признаков сердечной недостаточности скорость процесса существенно возрастает, но мы можем приостановить процесс как за счет мер профилактики, так и применения современных лекарственных препаратов. И только при далеко зашедших стадиях декомпенсации прогноз пациента становится тяжелым и требует интенсивного медикаментозного или хирургического лечения (пересадка сердца, искусственный левый желудочек, кардиовертер и т. д.).

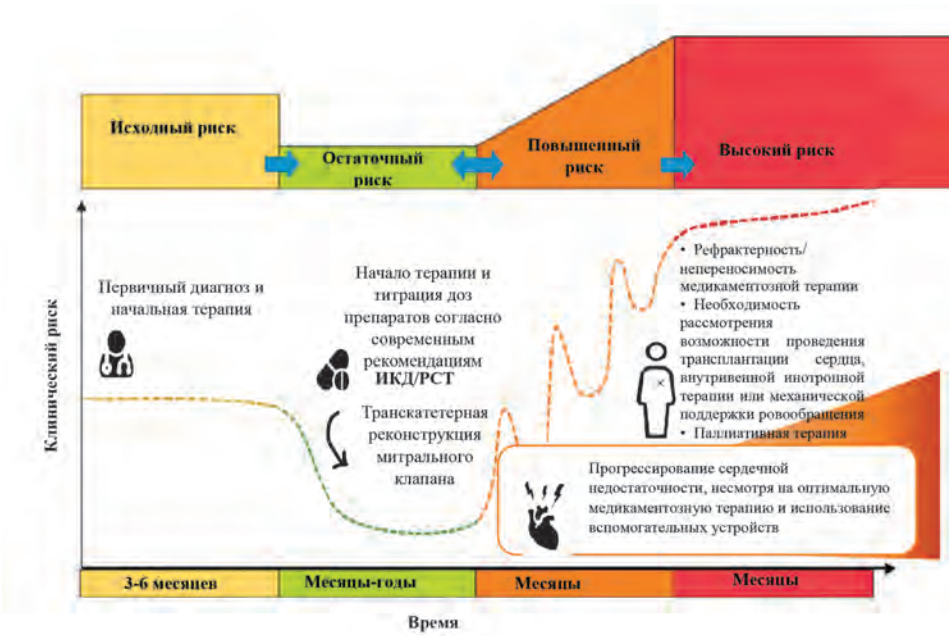

Рисунок 12. Профиль риска сердечной недостаточности с течением времени
ИКД – имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор; РСТ – ресинхронизирующая терапия.

За последние десятилетия выживаемость данных больных увеличилась почти в 10 раз, но они до сих пор остаются наиболее тяжелыми кардиологическими пациентами, и это требует совместных усилий кардиологов и представителей фундаментальной науки.

Список литературы

4. *Adamo L., Rocha-Resende C., Prabhu S. et al.* Reappraising the role of inflammation in heart failure. Nat Rev Cardiol 2020; 17(5):269–85.
5. *Apstein C., Morgan J.* Cellular mechanisms underlying left ventricular diastolic dysfunction. Left ventricular diastolic dysfunction and heart failure. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger 1994; 1994:3–24.
6. *Barry S., Davidson S., Townsend P.* Molecular regulation of cardiac hyper- trophy. Int J Biochem Cell Biol 2008; 40:2023–39.
7. *Bell S., Nyland L., Tischler M. et al.* Alterations in the determinants of diastolic suction during pacing tachycardia. Circ Res 2000; 87(3):235–40.
8. *Bellinger D., Lorton D.* Autonomic regulation of cellular immune function. Auton Neurosci 2014 May; 182:15–41.
9. *Bergmann O., Bhardwaj R., Bernard S. et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science 2009; 324:98–102.
10. *Borbély A., van der Velden J., Papp Z. et al.* Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. Circulation 2005; 111(6):774–81.
11. *Brutsaert D., Sys S.* Diastolic dysfunction in heart failure. J Card Fail 1997 Sep; 3(3):225–42.

12. *Carreño J., Apablaza F., Ocaranza M. et al.* Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. Rev Esp Cardiol 2006 May; 59(5):473–86.

13. *Cazorla O., Freiburg A., Helmes M. et al.* Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. Circ Res 2000 Jan 7-21; 86(1):59–67.

14. *Chai R., Xue W., Shi S. et al.* Cardiac Remodeling in Heart Failure: Role of Pyroptosis and Its Therapeutic Implications. Front Cardiovasc Med 2022; 9:870924.

15. *Cohn J., Johnson G., Shabetai R. et al.* Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. Circulation 1993; 87(6 Suppl):VI5–16.

16. *Colliva A., Braga L., Giacca M. et al.* Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease. J Physiol 2020 Jul; 598(14):2923–2939.

17. *Douglas P., Morrow R., Ioli A. et al.* Left ventricular shape, afterload and survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1989; 13(2):311–5.

18. *Dzau V., Braunwald E.* Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. Am Heart J 1991 Apr; 121(4 Pt 1):1244–63.

19. *Emori T., Hirata Y., Ohta K. et al.* Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. Hypertension 1991; 18(2):165–70.

20. *Evans J., Maddux B., Goldfine I.* The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. Antioxid Redox Signal 2005; 7(7-8):1040–52.

21. *Ferrario C.* Cardiac remodelling and RAS inhibition. Ther Adv Cardiovasc Dis 2016; 10(3):162–71.

22. *Fiedler B., Lohmann S., Smolenski A. et al.* Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(17):11363–8.

23. *Filomeni G, De Zio D, Cecconi F.* Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. Cell Death Differ 2015 Mar; 22(3):377–88

24. *Florea V., Henein M., Anker S. et al.* Relation of changes over time in ventricular size and function to those in exercise capacity in patients with chronic heart failure. Am Heart J. 2000 May; 139(5):913–7.

25. *Frangogiannis N.* Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. Mol Aspects Med 2019; 65:70–99.

26. *Frangogiannis N.* Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. Physiol Rev 2012; 92(2):635–88.

27. *Frantz S., Falcao-Pires I., Balligand J. et al.* The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC. Eur J Heart Fail 2018; 20(3):445–459.

28. *Garcia M., Smedira N., Greenberg N. et al.* Color M-mode Doppler flow propagation velocity is a preload insensitive index of left ventricular relaxation: animal and human validation. J Am Coll Cardiol 2000; 35(1):201–8.

29. *Greene S., Fonarow G., Butler J.* Risk Profiles in Heart Failure: Baseline, Residual, Worsening, and Advanced Heart Failure Risk. Circ Heart Fail 2020; 13(6):e007132.

30. *Gulick T., Chung M., Pieper S. et al.* Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Sep; 86(17):6753–7.

31. *Harris T., Baicu C., Conrad C et al.* Constitutive properties of hypertrophied myocardium: cellular contribution to changes in myocardial stiffness and viscosity. Circulation 1998; 98(Suppl):I–649.

32. *He X., Zeng H., Chen S. et al.* Endothelial specific SIRT3 deletion impairs glycolysis and angiogenesis and causes diastolic dysfunction. J Mol Cell Cardiol 2017; 112:104–113.

33. *Hou W., Hao Y., Sun L. et al.* The dual roles of autophagy and the GPCRs-mediating autophagy signaling pathway after cerebral ischemic stroke. Mol Brain 2022; 15(1):14.

34. *Humeres C., Frangogiannis N.* Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. JACC Basic Transl Sci 2019; 4(3):449–467.

35. *Hunter J., Chien K.* Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N Engl J Med 1999; 341(17):1276–83.

36. *Ji N., Qi Z., Wang Y. et al.* Pyroptosis: A New Regulating Mechanism in Cardiovascular Disease. J Inflamm Res 2021; 14:2647–66.

37. *Jia C., Chen H., Zhang J. et al.* Role of pyroptosis in cardiovascular diseases. Int Immunopharmacol 2019; 67:311–8.

38. *Kajstura J., Rota M., Cappetta D. et al.* Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. Circulation 2012; 126(15):1869–81.

39. *Kerkelä R., Ulvila J., Magga J.* Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. J Am Heart Assoc. 2015; 4(10):e002423.

40. *Kono T., Sabbah H., Rosman H. et al.* Left ventricular shape is the primary determinant of functional mitral regurgitation in heart failure. J Am Coll Cardiol 1992; 20(7):1594–8.

41. *LeWinter M., Granzier H.* Cardiac titin: a multifunctional giant. Circulation 2010; 121(19):2137–45.

42. *Liu P., Wang H., Li X. et al.* α-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. Nat Immunol 2017; 18(9):985–994.

43. *Ma Y., Mouton A., Lindsey M.* Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. Transl Res 2018 Jan; 191:15–28.

44. *Mackey D., McFall A.* MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. Mol Microbiol. 2006; 61(6):1365–71.

45. *Mangiafico S., Costello-Boerrigter L., Andersen I. et al.* Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. Eur Heart J 2013; 34:886–893c.

46. *Mann D.* Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. Circ Res 2002; 91(11):988–98. 12456484.

47. *Mann D.* The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. Circ Res 2011;108(9):1133–45.

48. *Martelli D., Yao S., McKinley M. et al.* Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. J Physiol 2014; 592(7):1677–86.

49. *McKee P., Castelli W., McNamara P. et al.* The natural history of congestive heart failure; the Framingham Study. N Engl J Med 1971; 285:1441–1446.

50. *Mehra M., Uber P., Francis G.* Heart failure therapy at a crossroad: Are there limits to the neurohormonal model? J Am Coll Cardiol 2003; 41(9):1606–10.

51. *Mouton A., Hall J.* Novel roles of immunometabolism and nonmyocyte metabolism in cardiac remodeling and injury. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2020; 319(4):R476-R484.

52. *Munzel T., Gori T., Keaney J. et al.* Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. Eur Heart J 2015; 36(38):2555-64.

53. *Nagueh S., Zoghbi W.* Clinical assessment of left ventricular diastolic filling by Doppler echocardiography. ACC Curr J Rev 2001; 10:45–49.

54. *Neubauer S.* The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med 2007; 356(11):1140-51.

55. *Niwa Y., Nagata N., Oka M. et al.* Production of nitric oxide from endothelial cells by 31-amino-acid-length endothelin-1, a novel vasoconstrictive product by human chymase. Life Sci 2000; 67(9):1103-9.

56. *Nordberg J., Arnér E.* Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; 31(11):1287-312.

57. *Ommen S., Nishimura R., Appleton C. et al.* Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. Circulation 2000; 102(15):1788-94.

58. *Opie L.* Cellular basis for therapeutic choices in heart failure. Circulation 2004; 110:2559–61.

59. *Opie L., Commerford P., Gersh B. et al.* Controversies in ventricular remodelling. Lancet 2006; 367:356–67.

60. *Patel B., Bansal S., Ismahil M. et al.* CCR2+ Monocyte-Derived Infiltrating Macrophages Are Required for Adverse Cardiac Remodeling During Pressure Overload. JACC Basic Transl Sci 2018; 3(2):230–244.

61. *Peterzan M., Lygate C., Neubauer S. et al.* Metabolic remodeling in hypertrophied and failing myocardium: a review. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2017; 313(3):H597–H616.

62. *Petry A., Görlach A.* Regulation of NADPH Oxidases by G Protein-Coupled Receptors. Antioxid Redox Signal. 2019; 30(1):74–94.

63. *Pinto A., Ilinykh A., Ivey M. et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. Circ Res 2016; 118(3):400–9.

64. *Porrello E., Mahmoud A., Simpson E. et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. Science 2011; 331:1078–1080.

65. *Prabhu S., Frangogiannis N.* The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. Circ Res 2016; 119(1):91–112.

66. *Restini C., Garcia A., Natalin H. et al.* Signaling Pathways of Cardiac Remodeling Related to Angiotensin II. Renin-Angiotensin System – Past, Present and Future. 2017; Available from:http://dx.doi.org/10.5772/66076

67. *Rich S., McLaughlin V.* Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. Circulation 2003; 108(18):2184–90.

68. *Saadat S., Noureddini M., Mahjoubin-Tehran M. et al.* Pivotal Role of TGF-β/Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players. Front Cardiovasc Med 2021; 7:588347.

69. *Sabbah H., Goldstein S.* Ventricular remodelling: consequences and therapy. Eur Heart J 1993 Jul;14 Suppl C:24–9.

70. *Sadoshima J., Izumo S.* Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. Circ Res 1993; 73:424–38.

71. *Saks V., Belikova Y., Kuznetsov A.* Phosphocreatine pathway for energy transport: ADP diffusion and cardiomyopathy. Am J Physiol 1991; 261(4):30–8.

72. *Samak M., Fatullayev J., Sabashnikov A. et al.* Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. Med Sci Monit Basic Res. 2016;22:75–9.

73. *Schirone L., Forte M., Palmerio S. et al.* A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:3920195.

74. *Senyo S., Steinhauser M., Pizzimenti C. et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. Nature 2013; 493(7432):433–6.

75. *Shieh J., Srivastava D.* Heart malformation: what are the chances it could happen again? Circulation 2009; 120(4):269–71.

76. *Spinale F., Coker M., Krombach S. et al.* Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function. Circ Res 1999; 85(4):364–76.

77. *Swirski F., Nahrendorf M.* Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. Nat Rev Immunol 2018; 18(12):733–744.

78. *Taegtmeyer H., Young M., Lopaschuk G. et al.* Assessing Cardiac Metabolism: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circ Res 2016; 118(10):1659–701.

79. *Tagawa H., Wang N., Narishige T. et al.* Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy. Circ Res 1997; 80(2):281–9.

80. *Takimoto E., Kass D.* Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. Hypertension 2007; 49(2):241–8.

81. *Tang BL.* mTOR, autophagy, and reprogramming. Front Cell Dev Biol 2014; 1:4.

82. *Tirziu D., Chorianopoulos E., Moodie K. et al.* Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice. J Clin Invest 2007; 117(11):3188–97.

83. *Toldo S., Abbate A.* The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. Nat Rev Cardiol 2018; 15(4):203–214.

84. *Toldo S., Mezzaroma E, O'Brien L. et al.* Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014; 306(7):H1025–31.

85. *Tran D., Wang Z.* Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. J Am Heart Assoc 2019; 8(12):e012673.

86. *Travers J., Kamal F., Robbins J. et al.* Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. Circ Res. 2016 Mar 18; 118(6):1021–40.

87. *Trombitás K, Jin JP, Granzier H.* The mechanically active domain of titin in cardiac muscle. Circ Res 1995; 77(4):856–61.

88. *Tsai S., Lu G., Xu X. et al.* Enhanced endothelin-1/Rho-kinase signalling and coronary microvascular dysfunction in hypertensive myocardial hypertrophy. Cardiovasc Res 2017; 113(11):1329–1337.

89. *Xia S., Hollingsworth L., Wu H.* Mechanism and Regulation of Gasdermin-Mediated Cell Death. Cold Spring Harb Perspect Biol 2020; 12(3):a036400.

90. *Yokoyama T., Vaca L., Rossen R. et al.* Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. J Clin Invest 1993; 92(5):2303–12.

91. *Zentilin L., Puligadda U., Lionetti V. et al.* Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. FASEB J 2010; 24(5):1467–78.

92. *Zhang H., Yin Y., Liu Y. et al.* Necroptosis mediated by impaired autophagy flux contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. Biochem Pharmacol 2020; 175:113915.

93. *Zhang S., Bories G., Lantz C. et al.* Immunometabolism of Phagocytes and Relationships to Cardiac Repair. Front Cardiovasc Med 2019; 6:42.

94. *Zhang W., Chancey A., Tzeng H. et al.* The development of myocardial fibrosis in transgenic mice with targeted overexpression of tumor necrosis factor requires mast cell-fibroblast interactions. Circulation 2011; 124(19):2106–16.

95. *Zheng W., Seftor E., Meininger C. et al.* Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280(2):H909–17.

96. *Zhi X, Feng W, Rong Y. et al.* Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. Cell Mol Life Sci 201; 75(5):815–831.

97. *Zhou P., Cheng C., Li T. et al.* Modulation of cardiac L-type Ca2+ current by angiotensin-(1-7): normal versus heart failure. Ther Adv Cardiovasc Dis 2015; 9(6):342–53.

98. *Zile M., Baicu C., Ikonomidis J. et al.* Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. Circulation. 2015; 131(14):1247–59.

99. *Zile M., Cowles M., Buckley J. et al.* Gel stretch method: a new method to measure constitutive properties of cardiac muscle cells. Am J Physiol 1998; 274(6 Pt 2):H2188–202.

100. *Zile M., Richardson K., Cowles M. et al.* Constitutive properties of adult mammalian cardiac muscle cells. Circulation. 1998; 98(6):567–79.

Глава 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ПОЧКИ

Ю.В. Наточин

Введение

Поиск адекватных и значимых для клиницистов физиологических методов изучения деятельности почек у пациентов стал разрабатываться на рубеже XIX–XX вв. В клинике в то время болезни почек изучались в курсе внутренних болезней. Нефрология как самостоятельная дисциплина сформировалась лишь в средине XX в. Ее назначение состояло в изучении этиологии, патогенеза и особенностей клинического течения болезней почек, разработке методов их диагностики, лечения и профилактики. Основное функциональное назначение почек рассматривалось как деятельность органа выделения. Физиологические исследования были направлены на разработку методов исследования, применимых в клинической практике [5, 6, 9, 10, 24, 36, 52]. В этой главе будет предпринята попытка дать ответ на важнейшие вопросы, касающиеся современных представлений о роли почек в организме человека, их функциях и дисфункциях, что обеспечивает возможность выявить отклонения в их деятельности от нормы, существенные для постановки диагноза, назначения обоснованного лечения.

Функции и дисфункции почек

Изучение физиологии почек, внедрение гемодиализа выявило формы патологии, связанные с неэкскреторными функциями почек, и ясно показало, что основная функция почек состоит в обеспечении гомеостаза [2, 14, 53]. По современным представлениям почки человека выполняют 8 функций, а их нарушение вызывает ряд дисфункций (таблица 1).

Таблица 1. Функции и дисфункции почек

Функции	**Дисфункции**
Осморегуляция	Гипоосмоляльность, гиперосмоляльность
Волюморегуляция	Отеки, гиповолемия
Ионорегуляция	Гипо- или гиперионемия
Регуляция pH крови	Ацидоз, алкалоз
Инкреторная	Гипертензия, анемия
Экскреторная	Уремия
Метаболическая	Гипогликемия, аминоацидурия, протениурия
Иммунорегуляция	Нарушенние иммунного ответа

Физиологической основой выполнения функций почек служат процессы мочеобразования (гломерулярная фильтрация, реабсорбция, секреция, синтез), и роль каждого из них имеет значение в реализации отдельных функций почек (таблица 2) [3, 14].

Таблица 2. Процессы мочеобразования и функции почек

Функции почек	**Гломерулярная фильтрация**	**Реабсорбция**	**Секреция**	**Синтез**
Осморегуляция	+	+		
Волюморегуляция	+	+		
Ионорегуляция	+	+	+	
Регуляция pH крови	+	+	+	
Инкреторная	+	+		+
Метаболическая	+	+		+
Иммунорегулирующая	+	+		

Разработанные методы исследования позволяют не только качественно оценить состояние основных процессов, обеспечивающих деятельность почек, но и дать их численное значение, а также очертить, в каких пределах оно может меняться. Чтобы знать пределы изменения функционального состояния почек, были разработаны нагрузочные пробы [38, 52], применение которых позволило ответить на вопрос о функциональных резервах почек у данного человека, о степени отклонения параметров нормы деятельности почек при патологическом процессе, адекватности и характере регуляции каждой функции.

Использование понятий в клинической физиологии почки – процессы мочеобразования и функции – имеет принципиальное значение для клинициста [14]. Первая часть касается соотношения процессов в почке, вторая – проблем распределенных функций в целостном организме [19, 20].

Комиссия по физиологии почек Международного союза физиологических наук (IUPS) в 80-е гг. XX в. разработала единую номенклатуру структур нефрона, чтобы во всех публикациях по физиологии почки и нефрологии был использован единый стандарт. Более того, эта работа вопреки правилам была одобрена редколлегиями и опубликована одновременно в трех ведущих международных журналах (Kidney Int., Am. J. Physiol., Eur. J. Physiol.) [46], мне как соавтору этой номенклатуры было разрешено опубликовать ее полный текст в переводе на русский язык. В этой главе (рис. 1) дана эта структура нефрона, чтобы читателю легко было соотносить данные с морфологическими компонентами структур в почке.

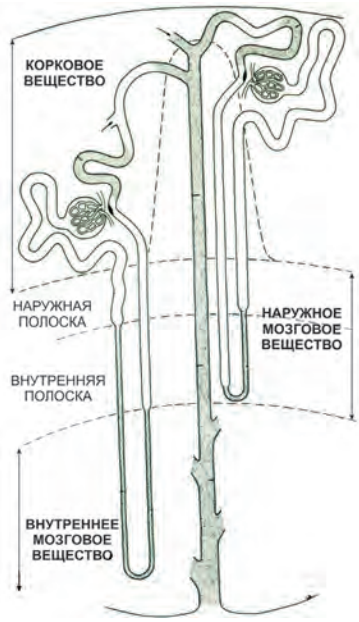

Рисунок. 1. Схема нефрона

На схеме представлены нефроны с короткой петлей и с длинной петлей и система собирательных трубок. Пропорции рисунка не соответствуют истинному масштабу. Внутри коры мозговой луч обозначен штриховой линией. 1 – почечное тельце, включающее капсулу Боумена и клубочек (клубочек капилляров); 2 – проксимальный извитой каналец; 3 – проксимальный прямой каналец; 4 – нисходящее тонкое колено; 5 – тонкое колено; 6 – дистальный прямой каналец (толстое восходящее колено); 7 – плотное пятно (macula densa), локализованное внутри конечной части толстого восходящего колена; 8 – дистальный извитой каналец; 9 – связующий каналец; 9* – связующий каналец юкстамедуллярного нефрона, который образует аркаду; 10 – собирательная трубка коры почки; 11 – собирательная трубка наружного мозгового вещества; 12 – собирательная трубка внутреннего мозгового вещества.

Естественно, клиницисты при рутинном обследовании пациента заинтересованы в точном, корректном измерении численных значений каждого процесса, лежащего в основе мочеобразования. Описание способов измерения гломерулярной фильтрации, реабсорбции и секреции отдельных неорганических и органических веществ было разработано Г. Смитом [52] и вошло в практику экспериментаторов и клиницистов [5, 15, 44]. В основе расчета гломерулярной фильтрации было измерение концентрации тест-веществ (инулин, креатинин) в сыворотке крови и моче для расчета клиренса этих веществ как начального параметра процесса образования мочи и возможности дать оценку производных от нее показателей реабсорбции и секреции веществ в канальцах.

Клиническая физиология позволяет не только дать оценку состояния каждого из процессов, лежащих в основе мочеобразования, но в случае

отклонения от нормы выяснить, вызваны ли они генетическим дефектом (наследственные формы патологии) или дисфункция обусловлена иными причинами. Предполагаемое обследование пациента позволяет получить ответ на вопрос, что в почке нарушено, в какой степени это зависит от патологии одного из процессов, лежащих в основе мочеобразования. Для проведения обследования важную роль играет использование адекватных методов клинической нефрологии [26, 29, 31].

Важное значение клинической физиологии для врача состоит в том, что оно позволяет уменьшить число врачебных ошибок. Использование данных об известных формах патологии [13; 32], обнаруживаемых при увеличении или уменьшении концентрации вещества в сыворотке крови или моче позволяет не упустить редко встречающейся формы патологии. Выяснение роли каждого из органов в распределенной функции дает возможность проанализировать роль значимых для данной функции органов и систем их регуляции, что поможет патологии в дифференциальной диагностике при сложных формах (см. таблицу 5) [20]).

Полифункциональность органов, системная организация функций как одно из ключевых направлений клинической физиологии имеет значение для диагностики и разработки фундаментальной проблемы соподчиненности органов при реализации функций в организме [19]. Рассмотрение одного из примеров возможно на основе изменения объема выделяемой мочи. Экскреция мочи с высокой осмоляльностью свидетельствует об эффективности работы всех структур почек, а оценка клиренса креатинина, его концентрации в плазме позволяет оценить массу функционирующих нефронов. Важно обращать внимание на состояние систем регуляции, чтобы определить локусы секреции физиологически активных веществ. Сложная ситуация может быть следствием изменения секреции гормона эндокринной железой либо появления метастазов при злокачественном росте и развития синдрома неадекватной секреции гормона. Из этого примера следует необходимость выяснения для каждого органа спектра его функций, активностей, изменение которых может привести к заболеванию и должно быть выявлено при сборе анамнеза и тем самым необходимо для постановки диагноза. Целесообразно было бы понять, почему весьма разноплановые функции и именно такие сосредоточены в данном органе, какое позитивное значение это имеет для организма, сколь скоро закрепилось в процессе эволюции. Клинически такой подход открывает путь к выяснению патогенеза болезни и поиску адекватного лечения.

Почка имеет важное значение как один из органов системы выделения, но ее функции в организме намного шире – она обеспечивает контроль количества эритроцитов, регуляцию объема крови и внеклеточной жидкости, концентрацию каждого иона, в том числе ионизированного кальция, регуляцию уровня артериального давления, регуляцию кислотно-основного состояния [34: 50] и мн. др. Эти стороны деятельности почек обеспечивают физико-химическую стабильность жидкостей внутренней среды, а тем самым возможность эффективной работы всех органов и прежде всего мозга. Более того, почка освобождает мозг от бесчисленных забот, связанных с контролем концентрации каждого компонента жидкостей внутренней среды. Поэтому не удивительно, что минутный кровоток почек превышает кровоток мозга,

почка оказывается не только регулятором перечисленных функций, но и сенсором многих параметров жидкостей внутренней среды при участии структур юкстагломерулярного аппарата. Прикладное значение для клиники этих теоретических физиологических исследований состоит в том, что они дают ответ на вопрос о физиологических функциях и дисфункциях органа, симптомах их нарушений, места данного органа в системной организации каждой из функций организма.

Пандемия ковид 19 привлекла большое внимание к проблемам иммунологии. Эта наука получила стимул развития на рубеже XIX–XX вв., И. Мечников и П. Эрлих были отмечены за эти работы Нобелевской премией в 1908 г. Середина XX в. возродила интерес к проблемам иммунологии, появились выдающиеся открытия. В организме человека выявлен ряд органов, функции которых связаны с участием в иммунном ответе. Среди них редко упоминают почки, но в них ежемоментно происходит селекция в клубочках измененных белков, включая антитела, а если они изменены, то происходит их фильтрация в просвет нефрона с последующим расщеплением клетками канальцев до аминокислот и дипептидов. Аналогичная картина касается и полипептидов, тем самым почка оказывается одной из важных структур в ряду органов иммунного контроля наряду с желудочно-кишечным трактом и легкими. В почках обнаружены дендритные клетки.

Организация системы регуляции функций такова, что одновременно вовлекается не один, а часто несколько действующих факторов. У каждого из них собственная система секреции, параллельно происходит деградация в почке этих веществ. Так как цель – гомеостаз, стабилизация основных параметров, касающихся артериального давления, физико-химических параметров жидкостей внутренней среды, то возникает вопрос, как происходит координация эффекта органов при выполнении полиорганных функций для оптимального решения ежемоментно возникающих проблем при действии многочисленных внешних и внутренних влияний [17].

Нельзя не согласиться с мнением эндокринологов о ключевом значении измерения концентрация гормона в крови. Она зависит от его секреции железой внутренней секреции, скорости его деградации. Но не следует забывать при диагностике о возможности секреции гормона в необычных органах, изменении скорости его инактивации, разрушении гормона в крови и тканях, модуляции его эффекта. Важное значение имеет фильтрация в клубочках и инактивация гормонов в канальцах благодаря гидролизу в клетках нефрона. Дополнительным источником ряда гормонов в крови является их секреция микроорганизмами в кишке и их последующее всасывание нерасщепленными в кровь, например, окситоцина. Следующим элементом анализа служит выяснение состояния подтипов рецепторов гормонов в реализации ответа [49]. При почечной недостаточности растет концентрация различных гормонов в сыворотке крови из-за неспособности оставшихся нефронов к эффективной деградации пептидных и стероидных гормонов, что дополнительно неблагоприятно влияет на состояние пациентов.

Распределенная между несколькими органами и тканями функция [19] должна быть управляема из единого центра, чтобы сохранять целостность реакций и обеспечивать безусловное выполнение задач, стоящих в данный

момент перед организмом. При таком подходе к каждой функции становится ясно ее качественное сходство с принципами регуляции таких общих реакций особи как стресс или воспаление. В эти реакции вовлекаются разные системы во имя сохранения жизнеспособности организма и адекватного ответа на ежемоментно возникающие проблемы в зависимости от образа жизни пациента.

Клиническая физиология требует ответа на вопросы о механизмах дисфункции в целостном организме. В решении проблем физиологии участвуют исследователи с разным базовым образованием – врачи разных специальностей, биологи, физики, химики, психологи и мн. др. Вряд ли можно в наши дни обозначить при оценке физиологических публикаций специфические методы физиологических исследований, но тематика строго ограничена – физиологические процессы. Безусловно, в этой области науки публикуется много работ, в которых используют методы молекулярной биологии и генетики. В XIX в., XX в. грань между науками была в применяемых методах, в XXI в. поставленная задача должна дать ответ на вопрос не о методическом осуществлении работы, а относится ли она к проблемам физиологии или медицины, генетики или физико-химическим наукам. Все более значимым в физиологическом осмыслении проблем становится выяснение природы физиологических функций в целостном организме. Применяемые методы должны позволить в этом случае понять природу происходящих в организме процессов, часто ключевое значение приобретают выяснение особенностей регуляции, пути восстановления утраченных функций.

Почка выполняет несколько функций, нарушение которых клинически значимо, оно проявляется рядом симптомов, которые клиницист иногда характеризует как патологию почек, а они указывают не на дисфункции почек, а служат отражением системных эффектов, вызванных влиянием систем регуляции. Одна из функций почек – осморегулирующая, она обеспечивает постоянство осмоляльности сыворотки крови [14]. В норме у здорового человека этот показатель составляет около 288 мосм/кг H_2O. Он может снижаться до 280 мосм/кг H_2O, когда выпито много воды, или эта величина возрастает до 295 при длительном пребывании человека в условиях жаркого климата, при ограничении потребления воды. Чтобы поддержать осмоляльность крови в пределах нормы, почки человека изменяют осмоляльность мочи, регулируя реабсорбцию осмотически свободной воды. Поэтому осмоляльность мочи у здорового человека меняется в широких пределах от 50-60 мосм/кг H_2O, когда надо выделить избыток воды, до 1400 мосм/кг H_2O – когда требуется максимально всасывать воду, чтобы избежать гиперосмоляльности крови.

Физиологическое значение поддержания постоянной осмоляльности крови состоит в том, что оно должно обеспечивать стабилизацию объема каждой клетки организма. В этом состоит назначение системы осморегуляции, потому что нормальный, эффективный метаболизм каждой клетки возможен только при очень строгом поддержании ее объема. Кратко рассмотрим патологические состояния, при которых нарушена осморегулирующая функция почек. Снижение осмоляльности сыворотки крови наблюдается при водной интоксикации, гиперпродукции вазопрессина, синдроме неадекватной

секреции антидиуретического гормона. Такая ситуация может быть вызвана патологией легких, метастазами, гипокортицизмом, психогенной полидипсией, патологией образования аквапоринов в собирательных трубках, иногда наблюдается дефект осморецепторов, нарушение передачи сигнала от них в центральную нервную систему.

При патологии легких иногда гипоосмоляльность сыворотки наблюдается на фоне гипертермии, обезвоживания, что вызвано неадекватной избыточной продукцией вазопрессина. Это приводит к увеличению реабсорбции осмотически свободной воды, снижению осмоляльности крови, в итоге сочетанию гипоосмоляльности с гиповолемией. В этих условиях нельзя проводить избыточную инфузию жидкости для лечения гиповолемии, при этой форме патологии причина не в дефекте почек, а в нарушении регуляции их функции, усиленной реабсорбции воды в канальцах в результате патологически избыточной секреции вазопрессина. Способ лечения – блокада функции аквапоринов в клетках канальцев, что нормализует состояние пациента. Гиперосмоляльность сыворотки крови наступает при гипернатриемии, сахарном диабете, ХПН, эксикозе.

Волюморегулирующая функция почек обеспечивает поддержание постоянства объема жидкостей организма, прежде всего внутрисосудистой, внеклеточной жидкости, одним из проявлений дефекта служат отеки.

Ионорегулирующая функция почек отличается высокой селективностью, она обеспечивает стабильность концентрации в жидкостях внутренней среды каждого из жизненно важных элементов периодической системы Д.И. Менделеева. Участие почек заключается в стабилизации ионного состава в том, чтобы контролировать баланс между потреблением веществ с пищей, поддерживать их содержание в организме и концентрацию каждого иона сохранить оптимальной для адекватного метаболизма [1; 45; 51]. Дисфункции почек и систем их регуляции в данном случае находят выражение в увеличении или снижении концентрации в сыворотке крови того или иного иона, для обозначения этих состояний нами предложен термин гипо- гиперионемия (таблица 1).

Грамотное прочтение врачом данных лабораторного анализа требует учета не только данных об общей концентрации ионов, но и доли свободных ионов. В качестве примера рассмотрим данные о концентрации ионов кальция. У человека ключевое значение имеет концентрация ионизированного Ca^{2+}. В то же время часто в лабораторном анализе фигурирует только значение общего Ca, величина которого зависит от количества ионов кальция не только в виде свободных, но и связанных с белком или низкомолекулярными соединениями. Поэтому столь важно иметь данные о фракционном составе сыворотке крови, где при норме общего кальция 2.5 ммоль/л доля ионизированного составляет 1.15 ммоль/л. Высокие или низкие значения концентрации кальция очень значимы для деятельности почек, они могут зависеть от концентрации белков в сыворотке крови, связывающих эти ионы. Важно отметить, что, будучи связанными с белком эти ионы не участвуют в физиологической регуляции.

Важная проблема, требующая внимательного отношения клинициста, может быть объяснена на примере натрийуреза и его регуляции. Транспорт натрия при реабсорбции осуществляется при участии нескольких

молекулярных вариантов котранспортеров, насосов, натриевых каналов [48] (таблица 3). Изменение выделения натрия служит важным симптомом многих патологических состояний (таблица 4). Это важная функция, она касается объема внеклеточной жидкости, появления отеков. В регуляции реабсорбции натрия участвует много различных физиологически активных веществ (таблица 5). Каким образом достигается баланс натрия, какие факторы имеют ключевые значения, где центр контроля секреции тех или иных гормонов, влияющих на реабсорбцию ионов натрия? В этих условиях особое внимание должно касаться подбора диуретиков, чтобы при отеках не назначить разные по названию препараты, но действующие на один и тот же молекулярный локус в нефроне, а от того их одновременный прием лишен смысла (таблица 5).

Таблица 3. Молекулярные транспортеры при реабсорбции ионов натрия в почке

Транспортируемые вещества	**Тип переносчика, насоса**
Na+, K+, 2Cl-	Na+, K+, 2Cl- котранспортер (NKCC2)
Na+, Cl-	Na+, Cl- котранспортер
Na+, H+	Na+, H+ обменник (NHE-3)
Na+	Na+ канал (ENaC)
L-аскорбиновая к-та	Na – витамин С котранспортер (SVCT 1)
Глюкоза, Na+	Na-глюкоза котранспортер SGLT-1 (2:1-Na : глюкоза) Na-глюкоза котранспортер SGLT-2 (1:1-Na : глюкоза)
Na+, K+	Na, K – АТФаза

Таблица 4. Натрийурез при различных физиологических и патологических состояниях

Повышение	**Снижение**
Всасывание экссудатов	Гиперкортицизм
Осмотический диурез	Застойная сердечная недостаточность
Прием диуретиков	Острая олигурия
Постменструальный диурез	Предменструальная задержка жидкости
Сахарный диабет	Стресс
Сольтеряющая почка	Дефицит солей натрия в рационе
Схождение отеков	Отеки
Недостаточность минерало- кортикоидов	Диарея
Повышение содержания солей натрия в рационе	Профузное потоотделение
Крупозная пневмония (период разрешения)	Рвота

Таблица 5. Физиологически активные вещества, влияющие на транспорт ионов натрия в почечных канальцах [18]

Гормон, аутакоид	**Тип влияния**	**Экскреция натрия**
Адреномедуллин	Уменьшение реабсорбции	↑
Альдостерон	Увеличение реабсорбции	↓
Атриопептид	Уменьшение реабсорбции	↑
Уродилатин	Уменьшение реабсорбции	↑
Натриопептид мозга	Уменьшение реабсорбции	↑
Натриопептид эндотелия	Уменьшение реабсорбции	↑
Ангиотензин II	Увеличение реабсорбции	↓
Стимуляция симпатической нервной системы	Увеличение реабсорбции	↓
Простагландины E2	Уменьшение реабсорбции	↑
Окситоцин	Уменьшение реабсорбции	↑
Стимуляция V1a-рецепторов	Уменьшение реабсорбции	↑
Стимуляция V2-рецепторов	Увеличение реабсорбции	↓
Глюкагоноподбный пептид-1	Уменьшение реабсорбции	↑

Экскреторная функция почек одна из наиболее часто контролируемых в клинических условиях. Ее проявление состоит в выделении почкой конечных продуктов обмена веществ, избытка даже полезных веществ, но поступивших с пищей в большом количестве, они не сохраняются, не депонируются в организме, почки участвуют в выделении токсических соединений. В справочной литературе указано, сколько какого вещества обычно удаляется почкой, но при этом важно учитывать соотношение реального потребление данного вещества и физиологические возможности его выделения почками.

В обычных условиях, «в норме», выведение жидкости составляет 1.5-2 л, объем мочи зависит от объема потребляемой воды. В оценке этого параметра в клинике необходимо оценить причину увеличенного или сниженного объема экскретируемой жидкости, измерить осмоляльность сыворотки крови и мочи. Если почка способна в широких пределах варьировать осмоляльность мочи и поддерживать в нормальных границах осмоляльность сыворотки крови, значит, почка физиологически функционирует адекватно, а причина отклонений обусловлена изменением работы систем регуляции при нормальной работе почек. Известны ситуации, когда почки выделяют до 25 л мочи в сутки, поддерживая водный баланс и осморегуляцию. Клинически имеет значение выяснение причин, вызывающих изменение концентрации экскретируемых веществ почками, что может зависеть от нарушений их работы, изменения их регуляции эндогенными факторами или воздействием внешних агентов.

Изменение объема выделяемой мочи проявляется полиурией, олигурией или анурией. Полиурия может быть вызвана нарушением осмотического концентрирования (ХПН), увеличением экскреции осмотически активных веществ (осмотически диурез, сахарный диабет), изменением секреции

вазопрессина или нечувствительностью клеток канальцев к этому пептиду (несахарный, нефрогенный диабет).

Многочисленные причины лежат в основе олигурии или анурии. Они могут быть вызваны развитием острого гломерулонефрита, уремией, снижением объема внеклеточной жидкости (диарея, избыточное потоотделение, рвота, кровопотеря), тромбозом сосудов почки, рефлекторной анурией, отравлением.

Глубокий физиологический анализ факторов, влияющих на процессы, происходящие в организме или в почке, может дать адекватный ответ на вопрос о причине каждого отклонения ее функции от нормы. Именно в этом ключевая роль клинической физиологии почки, которая охватывает все виды анализа состояния пациента – от жалоб, отклонений при осмотре до анализа молекулярных изменений на всех известных к настоящему времени этапах реализации функций. Клиническая физиология включает анализ нормы и причины пограничных состояний, при которых увеличивается или уменьшается концентрация каждого вещества в сыворотке крови либо его нет в моче у здоровых и он выявляется при обследовании. В таблице 4 (Наточин, глава № 1 в этой книге) приводятся данные о концентрации некоторых веществ у детей первых месяцев жизни и взрослых здоровых обследованных, а также причины гипогликемии или гипергликемии (таблица 5). Такие данные практически для всех клинически значимых органических и неорганических веществ в сыворотке крови и мочи имеются в опубликованных справочниках и могут быть полезны в клинической практике [13, 32, 39].

Важная роль клинической физиологии в алгоритме постановки диагноза состоит в том, что имеются данные о концентрации каждого физиологически значимого вещества в сыворотке крови и моче у здорового человека [30] и известны экстремальные или патологические состояния, при которых снижается или растет концентрация изучаемого вещества в сыворотке крови или моче. Например, известна норма в отношении глюкозы, выявлены десятки состояний, когда наблюдается гипокалиемия или гипергликемия (таблица 5, [20]), глюкозурия (см. там же, таблица 6). Эти сведения имеются в отношении большинства клинически значимых веществ, они позволяют понять, какое звено метаболизма или его регуляции изменено, и построить физиологически обоснованную цепочку подходов для постановки диагноза.

Таблица 6. Локализация действия диуретиков [12].

Диуретик	Место действия в почечном канальце
Маннитол	Проксимальный отдел нефрона
Мочевина	
Сорбитол	
Ацетазоламид	
Дорзоламид	

Фуросемид	Толстый восходящий отдел петли Генле
Торасемид	
Буметамид	
Этакриловая кислота	
Гидрохлортиазид	Дистальный извитой каналец
Индапамид	
Хлорталидол	
Циклометиазид	
Амилорид	Собирательная трубка
Триамтерен	
Спиронолактон	
Финеренон	
Кониваптан	
Толваптан	

Почки здорового человека выполняют огромную работу по реабсорбции профильтровавшихся веществ. В сутки у здорового мужчины фильтруется более 24000 ммоль ионов натрия, а их экскреция составляет около 0,56 % (таблица 7). Трудно представить работу технических устройств, с такой точностью выполняющих свою функцию. Увеличение реабсорбции всего на доли % приведет к возникновению отеков, нарушению баланса электролитов в крови. Это касается любого химического вещества в сыворотке крови, из этого следует необходимость фундаментальных исследований природы этого явления. Организм в норме находит решение, какое выбирать соотношение секреции в кровь регуляторов процесса транспорта Na^+ в нефроне (таблица 5).

Таблица 7. Реабсорбция и экскреция веществ почкой человека (ммоль/24 ч.) [18].

Вещество	**Фильтрация в клубочке**	**Реабсорбция**	**Экскреция в % от фильтрации**
Натрий	24192	24057	0.56
Калий	778	698	10
Магний	104	96.2	7.2
Глюкоза	864	863.5	0.05
Мочевина	1030	580	48

Только понимание природы физиологических процессов в целостном организме может дать клинически взвешенный ответ на вопрос о способах эффективного лечения. Клиническая физиология способствует всестороннему анализу явления, учитывая особенности данного пациента как самостоятельного объекта изучения. Это позволяет оценить изменения функций почки у данного пациента, в ряде случаев изменение функции может быть не проявлением патологического процесса, а крайней формой гипертрофированной

нормы, ее высокой эффективности без перехода в патологическое состояние. Это важно учитывать при назначении лечения.

Параметры процесса мочеобразования

В клинической физиологии обобщенным показателем, важным для нефролога, является, прежде всего, степень сохранности гломерулярного аппарата как основы первого этапа мочеобразования. Вполне адекватным для этого оказался расчет клиренса эндогенного креатинина, и этот тест получил наибольшее распространение в практике лабораторного анализа. К концу XX в. стало ясно, что можно использовать для этих целей концентрацию креатинина в сыворотке крови без определения креатинина в моче и по формуле проводить расчет скорости клубочковой. С этой целью были разработаны специальные формулы, получившие широкое применение [38, 14]. Скорость клубочковой (гломерулярной) фильтрации (СКФ) рассчитывают по очищению (клиренсу) эндогенного креатинина (проба Реберга) либо по данным концентрации креатинина в сыворотке крови с использованием специальной формулы.

СКФ – это объем безбелковой жидкости (в мл), профильтровавшейся из плазмы крови в клубочках почек за одну минуту. СКФ используется как интегральный показатель функционального состояния почек. СКФ возрастает в норме после рождения, она меняется при патологии почки. В зрелом возрасте у мужчин она удерживается на постоянном уровне около 125 мл/мин при расчете на массу тела (70 кг, площадь поверхности тела 1.73 м^2), у женщин – 110 мл/мин 1.73 м^2. Величина СКФ зависит от почечного плазмотока, фильтрационного давления, фильтрационной поверхности, от массы действующих нефронов. После 40 лет эта величина с возрастом постепенно уменьшается. Снижение скорости клубочковой фильтрации наступает и при многих формах патологии почек.

Формулы для расчета скорости клубочковой фильтрации C_{Cr}:

Классическая:
$C_{Cr} = (U_{Cr} \cdot V) / P_{Cr}$,
где U_{Cr} – концентрация в моче, P_{Cr} – в сыворотке крови, V – диурез

по D. Cockroft, M. Gault:
мужчины
(140 – возраст) • масса тела (кг): 72 • P_{Cr}
женщины
(140 – возраст) • масса тела (кг) 0.85 : 72 • P_{Cr}

Основные морфо-функциональные особенности изменения почек у детей в процессе развития в норме включают: 1) повышение СКФ с возрастом; 2) увеличение объема реабсорбируемой в канальцах жидкости; 3) формирование мозгового вещества почки, в котором происходит осмотическое концентрирование мочи, этот процесс зависит от действия вазопрессина на почку.

Эти параметры сохраняются с 18 лет в течение 20-25 лет, а затем, после 45-50 лет СКФ постепенно снижается [8, 25, 40].

Нарушение функционального состояния почек часто сопровождается дефектом системы осмотического разведения и концентрирования мочи. Это проявляется в виде симптомов гипостенурии и изостенурии, что стало ясным уже в конце XIX в. и начале XX в. Физиологический механизм этих процессов был расшифрован [Smith, 1956], предложил несколько формул для расчета образования, экскреции или реабсорбции осмотически свободной воды. Во второй половине XX в. было присуждено несколько Нобелевских премий, авторы которых смогли выяснить химическую формулу гормонов окситоцина и вазопрессина, синтезировать эти пептиды. Удалось установить молекулярный механизм действия этих гормонов и роль цАМФ в передаче сигнала внутри клетки при действии вазопрессина. Было показано значение простагландинов в регуляции транспорта воды и ионов. Это создало основы для выяснения механизма действия вазопрессина в почке на транспорт воды [43] и ионов натрия [49].

Каскадная система регуляции функций

Помимо стандартной схемы регуляции, например действия нервного стимула (или гормона) на почку в организме млекопитающих и у человека, нами выявлена каскадная система регуляции функций, имеющая существенное клиническое значение. Выше речь шла о том, что для высокой эффективности работы всех органов у человека нужна система стабилизации параметров жидкостей внутренней среды, гомеостаз. Обычно на этом завершают обсуждение этой важнейшей физиологической проблемы, в то же время для организма имеет значение не только поддержание постоянства физико-химических параметров жидкостей внутренней среды, но и условия, при которых была бы предотвращена возможность их резкого изменения даже в обычных условиях. Во многих случаях на организм человека влияют факторы, вызывающие сдвиги состава крови. В обычной жизни питье избытка воды, потребление избытка солей вызовет изменение осмоляльности крови, что может быть чревато набуханием клеток или их сморщиванием, иными дисфункциями. Особенно опасны такие изменения при многих формах патологии у человека.

Оказалось, что для предотвращения резких сдвигов физико-химических параметров в организме человека функционирует выявленная нами каскадная система регуляции [21, 22]. Во время питья воды или потребления пищи происходит растяжение желудка, что служит стимулом секреции глюкагоноподобного пептида 1 (ГПП1). Вслед за секрецией этого инкретина (ГПП1) в зависимости от того, поступила ли в организм вода, углеводы, (глюкоза), соли, в кровь секретируется вазопрессин или инсулин, вовлекаются другие гормоны, организм стремится немедленно перевести эти вещества в ткани или быстро их экскретировать почкой [47]. Механизм эффекта состоит в том, что ГПП1 снижает реабсорбцию жидкости в проксимальном сегменте нефрона, в результате бóльшие объемы канальцевой жидкости поступают в дистальный сегмент нефрона, где под влиянием гормонов ускоряется

или замедляется их экскреция почкой, что предотвращает нарушения, сдвиги физико-химических параметров жидкостей внутренней среды, сыворотки крови. При нарушениях функции этой системы в условиях патологии наблюдаются изменения водно-солевого гомеостаза, например при сахарном диабете II типа. Тем самым оказалось, что реабсорбция жидкости, растворенных веществ и воды в проксимальном канальце не является облигатной, как считалось ранее, а тоже регулируется. Более того, этот физиологический механизм может быть использован для восстановления состава и объема внутренней среды при разнообразных физиологических условиях.

Клиническая физиология и нефрология

В 20 в. появилась новая наука – нефрология, стала разрабатываться клиническая физиология почек, задачей которой служит обобщение результатов исследований, посвященных деятельности почек. Первые монографии в XX в., где даны сведения о нарушениях работы почек, называли Болезни почек [27, 33], в середине XX в. стали применять специальный термин для этой науки – нефрология. В 1960 г.XX в. оформляется международное общество нефрологов. В 1967 г. в Праге O. Schück опубликовал книгу [38], в которой он дал лаконичное определение круга проблем, которые составляют суть этой новой науки: «Нефрология представляет собой отрасль медицины, изучающую патофизиологию и клинику болезней почек» (стр. 13). Обобщения [4, 16, 37, 42] были представлены в XX в. в книгах с кратким названием «Kidney» [41, 44, 48, 53] и «Нефрология».

Сопоставим круг проблем Нефрологии с Клинической физиологией почек. Эти направления частично перекрывают друг друга, но их взаимодействие полезно для клинической медицины и физиологии. Согласно исходным принципам клинической физиологии и проблемам распределенных функций, любые отклонения, различные особенности деятельности почек у данного пациента могут первично рассматриваться как проявление нарушений в организме, может происходить перераспределение деятельности органов и систем у этого человека. Это требует поиска причин отклонений и нахождение способа восстановления дефекта в почке или системах ее регуляции. Клиническая физиология дает более широкий охват вариантов для рассмотрения, а оттого и подходов к возможным способам лечения. В разнообразной палитре современных лекарственных средств, способов терапии должна проявляться особая осторожность для выполнения требования к врачу – «Не навреди».

Использование методов клинической физиологии почек часто требует применения нагрузочных проб [38]. Природа создала почки как орган с огромными резервными возможностями, но для их выявления необходимо применение нагрузочных проб. Почка парный орган, у здорового человека удаление одной почки не вызывает существенных изменений в функциональном состоянии организма. Более того после односторонней нефрэктомии быстро происходит компенсаторная гипертрофия оставшейся почки. Такие особенности физиологии почек позволяют организму справляться с поддержанием гомеостаза в условиях их серьезной патологии.

Клиническая физиология включает проблемы деятельности почек человека в экстремальных условиях, участия почек у здорового человека в адаптации к различным условиям жизни. Клиническая физиология рассматривает и роль здоровых почек при различных патологических состояниях организма.

Клиническая физиология необходима врачу для того, чтобы на картине физиологической нормы основных параметров показателей деятельности почек у здорового человека можно было рассмотреть отклонения у обследованного пациента. Это позволит ответить на вопрос о том, какие функции, связанные с деятельностью почек, нарушены, в какой степени отклонения касаются каждого из процессов, лежащих в основе мочеобразования (гломерулярная фильтрация, осмотическое концентрирование, реабсорбция, секреция, синтез), каково состояние систем регуляции, в том числе не вовлекаются ли органы, в норме не причастные к этим эффектам, какие изменения наблюдаются в выделении с мочой различных веществ, выяснить жалобы и нарушения параметров, зависимых от работы почек, – артериальное давление, эритропоэз, баланс электролитов и др. В этой связи важно понимать истинное физиологическое назначение почек в организме человека, которое отличается от приписываемой почкам основной функции выделения в организме человека. Основное назначение почек: обеспечить гомеостаз – динамическое постоянство физико-химических параметров жидкостей внутренней среды организма, внеклеточной жидкости. Исходя из такого подхода, клиницист должен обратить внимание на соответствие или отклонение от нормы концентрации в сыворотке крови каждого показателя, зависимого от деятельности почек. В почках человека кровоток в сутки составляет более тонны крови, фильтруется в клубочках около 180 л, реабсорбируется 178-179 л жидкости, а экскретируется 1-1.5 л. Такой расчет показывает, что колоссальные количества различных веществ реабсорбируются из просвета канальца в кровь и лишь малая доля от этой величины выделяется с мочой. Клинические нарушения этих показателей зависят от патологии, дефекта транспортеров, вызванных наследственными или врожденными болезнями, сдвигами в работе систем регуляции, действием токсикантов, изменением рациона, физической нагрузкой и мн. др.

В связи со сказанным клиническая физиология рассматривает состояние параметров сыворотки крови (см. таблицу 4, [20]), мочи, расчетных величин (клиренсы), но и при обследовании широко применяются функциональные нагрузочные пробы. Это связано с тем, что у почек огромные резервные возможности в норме, и тогда они справляются со своими функциями. Нагрузочные тесты позволяют определить степень сохранности процессов мочеобразования почек, их сохранившийся резерв по отношению к норме. Современные технические возможности обеспечивают определение размера каждой почки, их объема, состояние оттока жидкости, секреторную способность и мн. др. Но ключевое значение имеет оценка каждого из процессов, лежащих в основе мочеобразования (таблица 8).

Таблица 8. Основные параметры процесса мочеобразования у человека (мл/мин /1.73 м^2 площади поверхности тела)

Процесс	Среднее значение
Почечный плазмоток, мл/мин	630
Почечный кровоток, мл/мин	1170
Клубочковая фильтрация, мл/мин	120
Канальцевая реабсорбция жидкости, мл/мин	118
Функция противоточной системы, реабсорбция осмотически свободной воды, мл/мин на 100 мл клубочкового фильтрата	5
Экскреция осмотически свободной воды при 2% водной нагрузке (мл/мин) на 100 мл клубочкового фильтрата	14,7
Секреция ПАГ мг/мин	79
Реабсорбция глюкозы мг/мин	320

Часто причиной патологии почек служат воспалительные процессы, что выявляется при использовании широкого спектра методов иммунодиагностики. Важно понять функциональное назначение используемых проб. Клиническая физиология помогает в выборе лекарственных средств. Один из частых симптомов связан с появлением у пациентов отеков. К числу веществ, реабсорбируемое количество которых наиболее высоко, относятся ионы натрия. Их недостаточное выведение или усиление реабсорбции может стать причиной отеков. В регуляции реабсорбции натрия участвуют разнообразные физиологически активных вещества, в их числе гормоны, аутакоиды, медиаторы и др. Для лечения отеков применяют диуретики, они отличаются по химической структуре, месту и механизму действия. Чтобы подобрать эффективный для данного пациента натриуретик, надо знать не только механизм, но и локус его действия, побочные эффекты. Это важно, чтобы не были назначены вещества, влияющие на один и тот же отдел нефрона, надо применять препараты, уменьшающие побочные эффекты (например, снижающие потерю калия почкой) и др. [11, 12] (таблица 6).

Клинический анализ крови

Для лабораторной диагностики существуют строгие правила взятия проб крови для последующего анализа. Отсутствие предпочтительных условий взятия проб может означать, что условия не имеют значения, и показатель устойчиво удерживается в строгих параметрах, либо на него не обращают внимания и нет указаний об условиях проведения анализа.

Обычно полагают, что концентрация ионов, например Na+, K+ удерживается в большинстве случаев в узких пределах, почти не меняется в течение всей жизни. Оказалось, что это не так, например в отношении концентрации калия – она с возрастом снижается в сыворотке крови пропорционально числу прожитых дней жизни. При некоторых формах патологии имелось достоверное увеличение Na+/K+ коэффициента в сыворотке крови, хотя

концентрация обоих катионов остается в пределах нормы лабораторного анализа [23]. Так как это ключевые физико-химические показатели среды, в которой функционируют все клетки организма, приобретает существенное значение ответ на вопрос о диагностическом значении таких показателей и клиническом значении их восстановления до нормы.

Основные этапы становления физиологии и клинической физиологии почки

В 60-е гг. XVII в. М. Мальпиги описал тельце в почке, сохранившее его имя – Мальпигиево тельце. А.М. Шумлянский в 80-х гг. XVIII в. детально охарактеризовал структуру клубочка, в 30-е гг. XIX в. капсулу в нем точно описал У. Боумен. Во взаимодействии с физиологией почки сформировалась клиническая физиология почки в течение минувших двух столетий. К средине XIX в. была установлена структура нефрона, микроанатомия почки. Гипотеза о механизме мочеобразования как сочетание фильтрации жидкости в клубочке и ее последующей реабсорбции в канальцах нефрона была предложена К. Людвигом в 40-х гг. XIX в. Ему оппонировал Р. Гейденгайн, который привел экспериментальные данные о возможности секреции ряда веществ из крови в просвет нефрона клетками канальцев почки. В итоге точными физиологическими экспериментами, включая микропункцию клубочков и канальцев в 20-е гг XX в. были сформулированы принципы мочеобразования, которое включает 4 процесса: 1) гломерулярную фильтрацию; 2) канальцевую реабсорбцию ряда профильтровавшихся веществ; 3) канальцевую секрецию некоторых органических и неорганических веществ из крови клетками канальцев в просвет нефрона; 4) синтез некоторых новых веществ и их поступление в просвет канальца или в кровь [3; 35].

В 30-е гг. XX в. начались активные исследования в области клинической физиологии почек, направленные на разработку методов изучения процессов, обеспечивающих мочеобразование у человека в клинике. В традициях отечественной медицины было использование нагрузочных проб для оценки функционального состояния почек и их резервных возможностей [7], роли эндокринных факторов регуляции процессов мочеобразования. Одновременно на основании анализов крови и мочи с использованием метода очищения оценивалось состояние основных параметров деятельности почек, включая клубочковую фильтрацию, способность к осмотическому разведению и концентрированию мочи, экскрецию с мочой веществ, которых не должно быть в значительных количествах в моче у здорового человека, например белков, глюкозы.

На рубеже 50-60 гг. XX в. создается Международное общество нефрологов, начинает функционировать Европейский коллоквиум по физиологии почки и Renal Commission Международного союза физиологических наук. Помимо этих международных организаций по инициативе акад. В.Н. Черниговского в составе Научного совета АН СССР по проблеме «Физиология» организуется Проблемная комиссия по физиологии почек и водно-солевого обмена, которую мне было поручено создать и возглавить в 1965 г. В составе комиссии были физиологи, морфологи нефрологи, я пригласил войти в ее

состав профессоров М.Я. Ратнер (Москва), М.Г. Закса, А.Я. Ярошевского (Ленинград), Л.Н. Иванову (Новосибирск) и др.

Одной из характерных особенностей развития физиологии в нашей стране была взаимосвязь фундаментальной и прикладной науки. Это было одной из традиций школы И.П. Павлова, который проводил клинические среды. Его ученик и последователь Л.А. Орбели разработал методы исследования в эксперименте раздельно функций левой и правой почек, что дало возможность выяснить роль нервной регуляции процесса мочеобразования [24]. Его ученик А.Г. Гинецинский разрабатывал это направление исследований в созданном Л.А. Орбели в 1956 г. Институте эволюционной физиологии им. И.М. Сеченова. Это направление исследований продолжала развивать наша лаборатория и после того, как в 1962 г. не стало А.Г. Гинецинского.

Летом 1959 г. в Минске проходил 9-й съезд Всесоюзного физиологического общества им. И.П. Павлова, на котором состоялось впервые заседание секции по физиологии почки и водно-солевого обмена, председателем заседания был чл.-корр. АМН СССР проф. А.Г. Гинецинский (фото 2). Год спустя, в 1960 г., с 21 по 26 января А.Г. Гинецинский организовал в Институте эволюционной физиологии Совещание по вопросам водно-солевого обмена. На нем были представлены различные направления работ по физиологии почек и водно-солевого обмена в нашей стране. С докладами выступали чл.-корр. АМН СССР проф. А.Г. Гинецинский, проф. Б.Д. Кравчинский, проф. М.Г. Закс, Я.Д. Финкинштейн, Е.Б. Берхин, Ю.В, Наточин, И.И. Лихницкая и др. Различные формы обсуждения проблем физиологии почек и клинической физиологии проходили под эгидой Проблемной Комиссии по физиологии почек. В 1966 г. была проведена большая научная конференция по водно-солевому обмену и функции почек, посвященная А.Г. Гинецинскому.

Фото 2. Участники секции по физиологии почки на 9-м съезде Всесоюзного физиологического общества им. И.П. Павлова в г. Минске, 1959 г. В центре снимка: профессор А.Г. Гинецинский. Фото Ю.В. Наточина

В память об А.Г. Гинецинском по моему предложению конференция в 1966 г. была названа 2-й, полагая, что первое совещание в Ленинграде можно рассматривать как первую конференцию. В течение четверти века Проблемная Комиссия по физиологии почек провела более 15 Всесоюзных конференций и школ по физиологии водно-солевого обмена и функции почек в разных городах СССР – Ленинграде, Новосибирске, Орджоникидзе и др. В 1965 г.начала работать Проблемная Комиссия по физиологии почки Научного совета АН СССР, а год спустя нам удалось издать сборник работ «Современные проблемы физиологии и патологии почек и водно-солевого обмена». В те годы еще не было разделения на физиологию и клиническую физиологию почек, но реально одновременно шло формирование обоих направлений.

В 1960 г.в Эвиане состоялся Первый конгресс нефрологов, в котором приняло участие около 400 человек, в 1963 г., на Втором конгрессе, было около 900 участников, на третьем конгрессе в 1966 г. – более 2100 человек. Первое отечественное руководство по физиологии почки (отв. ред. Ю.В. Наточин) было издано в 1972 г. в издательстве «Наука» в серии «Руководство по физиологии». Два десятилетия спустя был издан том руководства «Физиология водно-солевого обмена и почки» [14] в серии «Основы современной физиологии». Это позволило привлечь специалистов по физиологии и клинической физиологии к совместной разработке проблем физиологи и патологии почек.

В декабре 1969 г. в Ленинграде, в гостинице «Европейская» состоялось собрание учредителей Общества нефрологов СССР, было приглашено 12 человек. В итоге было принято решение о создании Общества нефрологов во главе с акад. АМН СССР Е.М. Тареевым, в состав Президиума вошли от Ленинграда А.Я. Ярошевский и Ю.В. Наточин. Первый съезд Общества нефрологов был проведен в 1974 г. в Минске.

На рубеже 60–70 гг. Проблемная комиссия по физиологии почки сотрудничала с различными международными организациями, развивалась совместная работа с Международным союзом физиологических наук, Европейским коллоквиумом по физиологии почек, Советско-американской рабочей группой по космической биологии и медицине. Основная научная концепция, развиваемая нами, заключалась в признании ключевой роли почек в создании и обновлении жидкостей внутренней среды, роли почек в адаптации к действию экстремальных факторов, включая полет в космос, разработку общих принципов эволюции функций почки, включая проблемы патологии и клинической физиологии. Эти исследования позволили выявить нарушения функций почки при патологии.

Большое значение имела научно-организационная работа по проведению научных конференций и научных школ в различных республиках СССР, приглашение на эти мероприятия ведущих ученых различных стран мира под эгидой АН СССР, а затем РАН (фото 3). В этих мероприятиях участвовало до 400 человек ежегодно, на них читали лекции представители США, Франции, Германии, Австралии, Новой Зеландии, нашей страны, члены РАН, ведущие клиницисты СССР.

Фото 3. Участники Школы по физиологии почки в Трускавце, 1973 г. Фото Ю.В. Наточина

Оформление клинической физиологии почек как науки нефрологии произошло во второй половине XX в., поиск оптимальных вариантов организационных форм решения происходил в странах Западной Европы, США, нашей стране. В конце XIX в. – начале XX в. обсуждение проблем морфологии, физиологии почек было на съездах этих областей наук, в клинической медицине на съездах терапевтов, хирургов. Лишь к середине XX в., когда нефрология формируется как самостоятельная область знания, эти проблемы стали рассматриваться на заседаниях Общества нефрологов.

В те же годы проходили съезды нефрологов, где наряду с проблемами клинической нефрологии обсуждались вопросы физиологии почек, педиатрической нефрологии. Развитие клинической физиологии почек шло в разных организационных формах, в том числе было проведение научных школ по физиологии и патологии почек, когда в домах творчества собирались исследователи функции почек и проводились заседания в течение 7-10 дней, лекции, дискуссии, круглые столы, симпозиумы по актуальным вопросам теоретической и клинической нефрологии, физиологии почек. Регулярно стали проводиться конференции по фармакологии почек. В Ленинграде была организована школа нефролога – раз в 2 недели проходили лекции, а через 2 недели клинические разборы наиболее сложных форм патологии почек, которые каждый раз собирали более 200 участников – клиницистов, физиологов. Эти заседания проводили в конференц-зале Института эволюционной физиологии и биологии им. И.М. Сеченова или в Институте нефрологии 1 ЛМУ им. И.П. Павлова.

Активно осуществлялись международные связи по проблемам клинической физиологии. В лабораторию физиологии почки ИЭФБ им. И.М. Сеченова АН СССР приезжали и читали лекции по физиологии и патологии почек выдающиеся исследователи Европы и США – проф. K. Ullrich (Германия), проф. F. Morel (Франция), проф. K. Thurau (Германия), проф. H. De Wardener (Великобритания), проф. H. Valtin (США), проф. T. Morgan (Австралия) и др.

Ю.В. Наточин был включен в состав руководства Европейского Коллоквиума по физиологии почки, участвовал в его организации, начиная с первого заседания, с 1973 г. он был членом Renal Commision IUPS, которая создала единую концепцию структур нефрона [46].

Заключение

Клиническая физиология почки отражает стремление понять природу деятельности почек у человека и формы ее отклонений при патологии, назначение и в этом ключе поиск подхода к восстановлению функций почки, исходя из ее роли в организме. Помню встречу с выдающимися английскими физиологами и клиницистами H. de Wardener и D. Black, которые приезжали в нашу лабораторию в средине 60-х гг. вместе с чл.-корр. АМН СССР И.Е. Тареевой. Обсуждение касалось многих проблем, в том числе первых итогов применения для лечения искусственной почки, гемодиализа. Ранее предполагали, что почка – основной орган выделения и ее замещение при гемодиализе обеспечит эффективное удаление «шлаков» и надолго продлит жизнь пациентов. Как известно, этот подход вызвал разочарование, поскольку вскоре выяснилось, что появляется много побочных эффектов, осложнений. Причина была в том, что почки участвуют во многих процессах в организме, не только экскреторных, но и инкреторных. Изучение физиологических функций почки привело к разработке новых методов, в итоге истинному продлению жизни пациентов на диализе в течение нескольких десятков лет. De Wardener, с которым мы встретились 30 лет спустя на симпозиуме в США, напомнил о пациенте, о котором речь шла в Ленинграде. Оказалось, что он на диализе прожил 28 лет и погиб в автомобильной катастрофе. Желание понять физиологию почек, их роль в организме имеет ключевое значение в диагностике дисфункций почки и назначении патогенетического лечения.

Эта глава фактически служит введением в клиническую физиологию почки, применение новых методов терапии может обеспечить прогресс при лечении заболеваний [28]. В клинической физиологии водно-солевого обмена имеется много проблем, требующих использования физиологических подходов. Основные физико-химические константы сыворотки крови, такие как концентрация ионов калия, натрия, осмоляльность, входят в число постоянно поддерживаемых физико-химических параметров крови. Оказалось, что не только концентрация катионов, но их соотношение, например Na+/K+ отношение, служат важными, строго контролируемыми показателями [23]. Так, предвестником летального исхода при ковид-19 является его резкое увеличение, оно отражает тяжелое течение пневмонии. Возникает вопрос и требует решения, что отражает абсолютная величина концентрации этих катионов и каково значение расчетного параметра соотношения их концентрации ионов не между клеткой и средой, указывающих на трансмембранный градиент, а изменение этого коэффициента внутри одной среды – внеклеточной жидкости. Если оно столь диагностически значимо, то не исключена возможность независимой регуляции этого параметра и перераспределения этих катионов в организме под влиянием регуляторных систем для стабилизации этого показателя, а так вопрос никогда не анализировался, но он может иметь важное клиническое значение.

Раздельное рассмотрение функций почки и процессов мочеобразования имеет ключевое значение в дифференциальной диагностике локуса симптома – повреждения почек или имеются экстраренальные нарушения, и их надо искать в одном из компонентов распределенной функции в организме. Такой подход обусловит реальную пользу клинической физиологии в качестве инструмента выяснения локуса повреждения при постановке диагноза и выбора способа лечения. При таком подходе границы нормы, касающиеся процессов мочеобразования, характеризуются параметрами состояния функций почек, что находит отражение в способности поддерживать гомеостатические показатели крови. Таково реальное прикладное значение клинической физиологии. Более глубокое понимание молекулярных процессов, происходящих в структурах почки, зависит от результатов обследования и ответа на вопрос о формах патологии – затрагивает ли оно почку или другие системы в организме, от которых зависит регуляция деятельности почек.

Одно из биологических значений условного рефлекса состоит в создании защитных механизмов от возможных повреждающих эффектов факторов внешней среды или процессов, происходящих в самом организме. Следует обратить внимание на очевидное сходство защитных эффектов условного рефлекса с описанного нами эффекта каскадного механизма при участии ГПП-1. Его действие можно отнести к очень важному компоненту сохранения гомеостатических параметров сыворотки крови в клинической физиологии почек.

Очевидно, что в одной главе невозможно детально рассмотреть все аспекты клинической физиологии. Обсуждение ключевых проблем клинической физиологии почек представляет интерес для представителей разных разделов медицины для последующей разработки этого направления исследований. Такой подход существенен и для рассмотрения вопроса о включении клинической физиологии в интегративный курс для студентов медицинских вузов, медицинских факультетов на завершающем этапе образования. Наш опыт чтения лекций и проведения клинических разборов для студентов 6 курса показал, что он востребован студентами, очень хорошо посещается слушателями, развивает навыки клинического мышления. Клинико-физиологические разборы сложных пациентов посещаются не только студентами разных курсов, но и врачами города, студентами других медицинских вузов. Это свидетельствует о целесообразности развития этого направления не только как раздела фундаментальной науки, но и высшего образования на завершающем этапе подготовки врача.

Следует обратить внимание, что почки у человека получают до 25 % минутного объема крови, за сутки их кровоснабжение превышает тонну крови, а с мочой выделяется около 1-2 л жидкости. Не касаясь деталей, очевидно, что почки ежедневно возвращают в кровь из 180 л профильтровавшейся плазмы до 178 л и все те вещества, которые нужны для жизни. Из этого можно заключить, что почки – орган стабилизации основных физико-химических параметров крови. Новые данные показывают, что почка принимает участие в поддержании нормального объема всех клеток организма. Почки обеспечивают стабильность концентрации неорганических веществ в крови, ее pH. В почке секретируются физиологически активные вещества,

расщепляются многие профильтровавшиеся гормоны, медиаторы, антитела, измененные белки. В зависимости от ситуации в организме в почке в разной степени выражен глюконеогенез, почки участвуют в иммунных реакциях, важную роль они играют в балансе кальция, расщеплении и удалении токсичных веществ, конечных продуктов обмена. Многие из этих функций выполняются и в других органах организма, вследствие чего возникает необходимость, как обсуждалось выше, введения понятия распределенные функции. Смысл в том, что данная функция осуществляется в разных органах. Это приводит к необходимости обоснования поиска локуса и механизмов ответа, его регуляции, чтобы обеспечить адекватный ответ организма при осуществлении каждой его функции, диагностику локуса повреждения и появления симптома.

Предлагаемая схема функциональной организации систем, обеспечивающих гомеостаз, требует решения фундаментальной проблемы – координации деятельности органов, участвующих в осуществлении каждой функции в отдельности и всех вместе как регуляторного ансамбля целостного организма, где анализируется информация от афферентной системы, каждого параметра. Следует выяснить, где локализован центр управления и каким образом принимается решение об участии того или иного органа, каким образом осуществляется выбор физиологически активного вещества и в каком количестве оно должно быть секретировано для обеспечения гомеостаза.

Список литературы

1. *Айзман Р.И.* Регуляция гомеостаза калия: возрастные особенности. Нефрология и диализ 2001; 3(3):318–325.
2. *Баркрофт Дж.* Основные черты архитектуры физиологических функций. М.-Л.: Биомедгиз, 1937. 319 с.
3. *Вандер А.* Физиология почек. СПб.: Питер, 2000. 256 с.
4. *Витворт Дж.А., Лоренс Дж.Р. / Ред.* Руководство по нефрологии. М.: Медицина, 2000. 480 с.
5. *Гинецинский А.Г., Наточин Ю.В.* Методы количественной оценки функции почек. / В кн. Д.А. Бирюков (ред.) Физиологические методы в клинической практике. Изд. 2, Л.: Медицина, 1966. Стр. 156–196.
6. *Зарецкий И.И.* Клиническая физиология и методы функциональной диагностики почек. М.: Гос. изд-во мед. лит., 1963. 280 с.
7. *Зимницкий С.С.* Болезни почек (Брайтова болезнь). Казань: Изд. Комбината издательства и печати ТССР, 1924. 272 с.
8. *Игнатова М.С. (ред.)* Детская нефрология. Руководство для врачей. 3-изд. М.: МИЯ, 2011. 696 с.
9. *Камкин А.Г., Каменский А.А. (ред.)* Фундаментальная и клиническая физиология. Учебник для вузов. М.: Академия, 2004. 1072 с.
10. *Кравчинский Б.Д.* Современные основы физиологии почек. Л.: Медгиз, 1958. 364 с.
11. *Кукес В.Г.* Клиническая фармакология: Учебник. 4-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 1056 с.
12. *Кутина А.В., Наточин Ю.В.* Принципы изучения действия диуретиков. Экспер. и клинич. фармакология. 2018; 81(11):38
13. *Марина А.С., Наточин Ю.В.* Справочник педиатра. СПб.: СпецЛит, 2016. 159 с.

14. Наточин Ю.В. Физиология почки. В кн.: Физиология водно-солевого обмена и почки. Сер. Основы современной физиологии. СПб.: Наука, 1993. С. 202

15. Наточин Ю.В. Почка. Справочник врача. СПб.: СПбГУ, 1997. 208 с.

16. *Наточин Ю.В.* Нефрология и фундаментальная наука. Нефрология 2012; 16(1):9

17. Наточин Ю.В. Гомеостаз. Успехи физиол. наук 2017; 48(4):3–15.

18. *Наточин Ю.В.* Почка – орган выделения или сохранения? Успехи физиологических наук 2019; 50(4):14

19. Наточин Ю.В. Полифункциональность почки и система распределенных функций. Успехи физиологических наук 2022; 53(4):3

20. Наточин Ю.В. Глава в этой книге. 2023.

21. *Наточин Ю.В., Марина А.С., Кутина А.В.* Роль инкретина как интегратора регуляции баланса натрия и воды. Доклады Академии наук 2014; 458(2):239–242.

22. *Наточин Ю.В., Марина А.С., Шахматова Е.И.* Каскадная система регуляции осмотического гомеостаза. Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни 2020; 490(1): 77–80

[*Natochin Yu.V., Marina A.S., Shakhmatoba E.I.* The cascade system of osmotic homeostasis regylation. Doklady Biological Sciences. 2020. 490(1):5–8 (In Russ.)]

23. Наточин Ю.В., Прокопенко А.В., Кузнецова А.А., Шахматова Е.И. Функциональная диагностика синдрома неадекватной секреции антидиуретического гормона при пневмонии у детей. Педиатрия 2020; 99(2):95

24. Орбели Л.А. Физиология почек. В кн.: Орбели Л.А. Избранные труды. Т. 4. М, Л.: 1966. С. 85

25. Папаян А.В., Савенкова Н.Д. Клиническая нефрология детского возраста. СПб.: Левша, 2008. 600 с.

26. *Ратнер М.Я., Серов В.В., Томилина Н.А.* Ренальные дисфункции: (Клинико-морфологическая характеристика). М.: Медицина, 1977. 295 с.

27. *Рейзельман С.Д.* Болезни почек. Киев.: Мед. изд-во УССР, 1952. 332 с.

28. *Смирнов А.В.* Системный подход к анализу кардиоренальных взаимоотношений как первый шаг на пути к нефрологии формата П4. Нефрология 2011; 15(2):11–19.

29. *[Smirnov AV.* Systematic approach to the analysis of cardio-renal relations as a first step towards nephrology P4 format. Nephrology (Saint-Petersburg) 2011;15(2): 11–19 (In Russ.)].

30. *Смирнов А.В., Наточин Ю.В.* Нефрология: фундаментальная и клиническая. Нефрология 2019; 23(4):9 -Тареев Е.М. (Отв. ред.) Основы нефрологии. Т.1, 2. М.: Медицина, 1972. 944 с.

31. *Тареева И.Е. (отв. ред.)* Нефрология: Руководство для врачей. М.: Медицина, 2000. 688 с.

32. *Тиц Н.У. (ред.).* Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997. 960 с.

33. *Фольгард Ф., Фар Т.* Брайтова болезнь почек. Перевод с нем. под редакцией Готье ЭВ, Мелких СМ. Белтрестпечать, Минск, 1923, 343 с. [Volhard F, Fahr Th. Bright's renal diseases. Translation from German, edited by Got'e EV, Melkih SM. Minsk: Beltrestpechat', 1923, 343 p. (In Russ.)].

34. *Фролов Б.А.* Физиология и патология кислотно-основного состояния. М.: Медицина, 1998. 260 с.

35. *Шейман Д.А.* Патофизиология почки. М.-СПб.: Бином, 2016. 206 с.

36. *Шик О.* Нефрология практического врача. Прага: Гос. изд-во мед. лит., 1967. 341 с.

37. *Шулутко Б.И.* Нефрология 2002. Современное состояние проблемы. СПб.: Ренкор, 2002. 780 с.

38. *Шюк О.* Функциональное исследование почек. Прага: Авиценум, 1975. 334 с.
39. *Эмануэль В.Л.* Лабораторная диагностика заболеваний почек. СПб.: Тверь, 2006. 248 с.
40. *Эрман М.В.* Нефрология детского возраста: руководство для врачей. 2 изд. СПб.: Спецлит, 2010. 683 с.
41. *Ярошевский А.Я.* Клиническая нефрология (избранные труды). Л.: Медицина, 1971. 424 с.
42. *Alpern R.J., Hebert S.C. (Eds.)* Seldin and Geibisch's The Kidney. Physiology and pathophysiology. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2008. 1427 p.
43. *Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G.* Vasopressin: physiology, assessment, and osmosentation . J. Intern. Med. 2017; 282(4):284–297.
44. Brod J. The Kidney. London: Butterworth, 1973. 740 p.
45. *Hediger M.A., Mouht D.B., Rolfs A., Romero M.F.* The molecular basis of solute transport. In: Brenner B.M., Brenner a. Rector's the Kidney. Philadelphia: Saunders, 2004. 260
46. Kriz W., Bankir L., Bulger R.E., Burg M.B., Goncharevskaya O.A., Imai M., Kaissling B., Maunsbach A.B., Moffat D.B., Morel F., Morgan T.O., Natochin Yu.V., Tisher C.C., Venkatachalam M.A., Whittembury G., Wright F.S. A standard nomenclature for structures of the kidney. Amer. J. Physiology. Renal, Fluid and Electrolyte Physiology. 1988; 254(23):F1–F8.
47. *Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V.* Role of Vasopressin in the Regulation of Renal Sodium Excretion: Interaction with Glucagon-Like Peptide-1. J. Neuroendocrinol 2016. 2016; 28(4):1–8
48. Landowski C. P., Suzuki Y., Hediger M. The mammalian transporter families. In: Seldin and Giebischs the kidney. Physiology and Pathophysiology. Forth Edition. P. 91-146. Eds. R.J. Alpern, St.C. Hebert. Amsterdam: Elsevier, 2008.
49. *Natochin Yu.V., Golosova D.V.* Vasopressin receptor subtypes and renal sodium transport. Elsevier. Vitamins and Hormones 2020; 113:239-258
50. Rose B.D. Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders. New York.: Mcgraw-Hill, 1984. 702 p.
51. *Schrier R.W., Sharma S., Shchekochikhin D.* Hyponatra Cannon, 1929emia: more than just a marker of disease severity? Nat. Rev. Nephrol. 2013; 9(1):37–50.
52. *Smith H.W.* Principles of renal physiology. New York: Oxford Univ. Press, 1956. 231 p.
53. *Smith H.W.* The Kidney: Structure and Function in Health and Disease. New York: Oxford Univ. Press, 1951. 1049 p.

Глава 5. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

Ф.И. Атауллаханов, А.Н. Баландина, Л.Д. Колева, Е.И.Синауридзе, М.А. Пантелеев

Введение

Ткани и клетки всех многоклеточных организмов, начиная с губок, делятся на стационарные и мобильные. В то время как стационарные составляют основу организма и выполняют непрерывные функции структуры, общего метаболизма, движения, управления, нервной деятельности, мобильные отвечают на вызовы: они занимаются ростом, регенерацией, иммунитетом, гемостазом, размножением, изредка транспортом. Кровь является самой объемной из подвижных тканей организма, выполняет ряд критически важных ролей и характеризуется экстремальными условиями по давлениям и скоростям потока по сравнению с лимфой, слюной, спермой, спинномозговой жидкостью и другими.

Исключительные условия функционирования и требования к системе крови привели к важной специфике двух ее частей: гемостаза и эритроцитов. Гемостаз позвоночных эволюционировал в сторону максимальной эффективности и способности бороться с широким кругом повреждений и кровоизлияний в большом диапазоне условий. В силу отсутствия у человека волосяного или иного защитного покрова (ведущего к высоким рискам ранений), а также наземного образа жизни (ведущего к риску загрязнения раны), система гемостаза у Homo sapiens особенно эффективна. Возможно, именно эта эффективность, выражающаяся в склонности скорее активироваться по любому поводу, нежели рисковать кровопотерей, обуславливает лидирующую роль этой системы в патофизиологической картине широкого круга заболеваний, состояний и ситуаций (включая такие состояния как беременность и проблемы отторжения имплантируемых устройств). С другой стороны, система гемостаза, естественно, связана с управлением ростом сосудов и регенерацией, что обуславливает ее критическую роль в развитии организмов и онкологических заболеваниях. Не следует забывать, что компоненты системы гемостаза с необходимостью присутствуют и функционируют и в остальных жидкостях человеческого организма. Все эти обстоятельства определяют важное место, которое она занимает в этой главе.

Вторая важнейшая функция крови, выделяющая ее из ряда других мобильных тканей, – это функция переноса кислорода и множества других веществ. Необходимость в транспорте больших объемов кислорода привела организмы к потребности использовать сорбирующий пигмент. Однако, потребность еще повысить концентрацию пигмента упирается в проблему вязкости, которую позвоночные решили путем упаковки этого пигмента в специализированные клетки. В силу того что пигмент был на базе белка, обойтись везикулами или иными транспортерами не получалось: нужна

была живая клетка, способная бороться с осмосом. Млекопитающие пошли еще дальше, сделав эти клетки безъядерными и способными протискиваться через узкие капилляры, приводя к повышенной эффективности обмена кислородом. В результате эритроциты человека представляют собой высокоспециализированные транспортеры, обладающие рядом уникальных черт, направленных на оптимизацию указанных процессов. При этом они, разумеется, вынуждены решать ряд побочных задач, начиная от борьбы с окислительным стрессом и заканчивая ухищрениями для снижения вязкости крови, а также их использованием для ускорения адгезии тромбоцитов к поврежденному месту. Спектр ситуаций, где это может нарушиться, обуславливает патофизиологическую картину дефектов, которой посвящена вторая половина главы.

1.Физиология гемостаза

Система гемостаза человека – совокупность процессов, призванных «обслуживать» сосудистую систему, а именно: помогать ее формированию во время ангиогенеза, поддерживать непроницаемость сосудистой стенки на протяжение жизни, остановить кровопотерю при повреждении сосуда, участвовать в восстановительных процессах и бороться с распространением инфекции. Наиболее важной с медицинской точки зрения является функция остановки кровотечения и ее патологическая форма – образование тромбов, приводящих к тромбозу или эмболии и последующей ишемии. Основными участниками гемостаза являются тромбоциты, система плазменного свертывания и система фибринолиза.

1.1. Физиологические аспекты гемостаза

1.1.2. Тромбоцитарный гемостаз

Тромбоциты формируются в костном мозге путем отшнуровывания от мегакариоцита и попадают в кровоток в виде плоских безъядерных фрагментов мегакариоцитов. Тромбоциты обеспечивают первичный гемостаз в первые минуты после травмы, формируя в области повреждения сосуда тромбоцитарный агрегат. Поверхность тромбоцитов содержит большое количество рецепторов, необходимых для детекции повреждения сосуда, адгезии к нему, агрегации тромбоцитов между собой и передачи активирующих сигналов внутрь тромбоцита для формирования ответа на активацию. За первичную адгезию тромбоцита отвечает комплекс трех гликопротеинов (GPIb-GPIX-GPV), который связывается с A2 доменом развернутого в потоке фактора фон Виллебранда (ФВ).

Существует много различных веществ, вызывающих активацию тромбоцитов. Принято разделять сильные активаторы, которые могут полностью активировать тромбоцит, и слабые активаторы, вызывающие частичный ответ. К сильным активаторам относятся коллаген и тромбин. Коллаген – гликопротеин, который присутствует во внеклеточном матриксе, и контакт

с ним является сигналом о наличии повреждения. Тромбин – сериновая протеиназа, основной регуляторный белок каскада системы свертывания. К слабым активаторам относят АДФ и липидный эйкозаноид тромбоксан А2, действующий на тромбоциты схожим с АДФ образом. При полной активации тромбоцит меняет свою форму на сферическую, затем происходит образование ламеллиподий и филоподий. Отношение площади поверхности к объему при этом увеличивается, что, вероятно, облегчает агрегацию тромбоцитов. Такие тромбоциты называются *проагрегантными*, они формируют основу тромбоцитарного сгустка.

Часть тромбоцитов после активации испытывают клеточную гибель (рисунок 1). Чаще это тромбоциты с меньшим количеством митохондрий, при активации у них наблюдается больший подъем уровня кальция в цитоплазме [1]. В результате этого тромбоциты приобретают форму шара и экспонируют на своей поверхности отрицательно заряженные фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин (ФС), который в норме находится на внутреннем слое мембраны тромбоцита. Эти тромбоциты называются *прокоагулянтными*, так как их мембрана является необходимым участником работы системы плазменного свертывания. Часть мембраны прокоагулянтных тромбоцитов при этом отделяется в виде микровезикул (также содержащих фосфатидилсерин на поверхности). Таким образом, в процессе активации тромбоциты делятся на две субпопуляции.

Активация интегринов – трансмембранных гетеродимерных клеточных рецепторов, взаимодействующих с внеклеточным матриксом и передающих различные межклеточные сигналы – считается наиболее важным функциональным ответом тромбоцитов. Молекулы интегринов aIIbb3 могут значительно изменять свою аффинность к ФВ и фибриногену в процессе активации, напрямую влияя на формирование тромбоцитарных агрегатов. Помимо αIIbβ3, тромбоциты имеют ряд других интегринов, специфичных для коллагена, фибронектина, ламинина и других молекул [2,3]. Тромбоцитарные интегрины при активации и связывании своих лигандов могут инициировать сигнализацию «снаружи – внутрь», т. е. выполнять роль рецепторов.

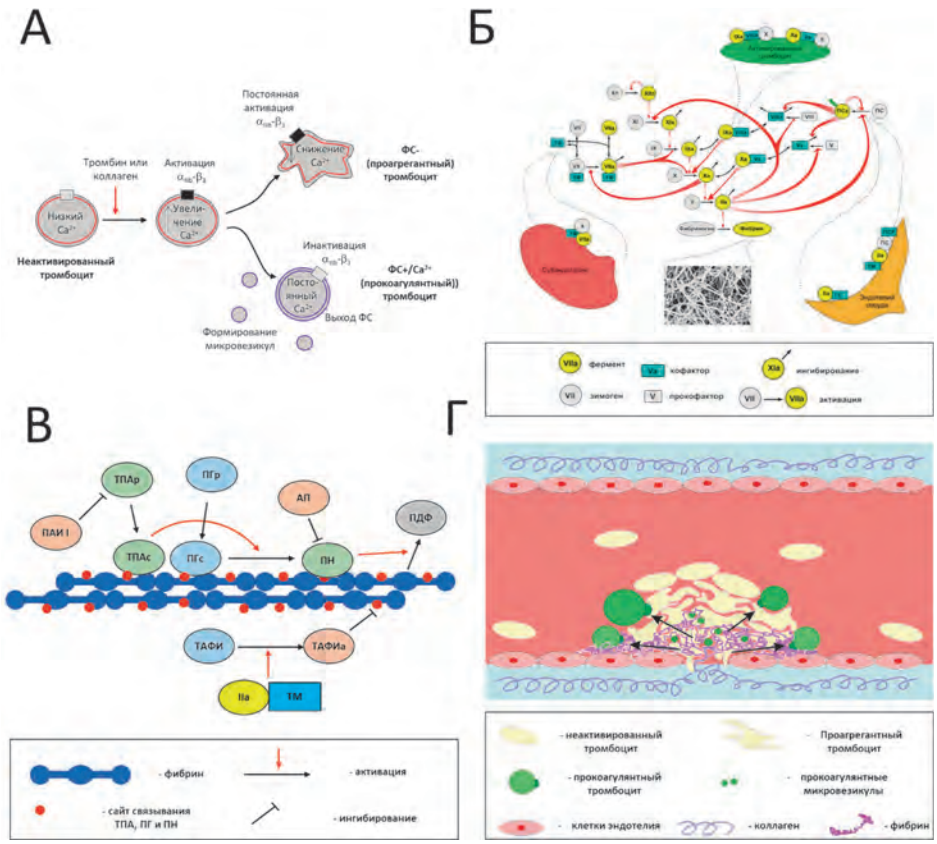

Рисунок 1. Физиология свертывания
А – Процесс активации тромбоцитов с разделением на две субпопуляции (воспроизведено с модификациями из [4]). Б – каскад свертывания (воспроизведено с модификациями из [5]). В – система фибринолиза. Г – структура тромба и разные субпопуляции тромбоцитов (воспроизведено с модификациями из [6]).
Обозначения: приставка «а» – активированный фермент, приставка «р» – фермент в растворе, «с» – связанная форма фермента, ПДФ – продукты деградации фибрина.

Кроме этого, при активации тромбоциты секретируют содержимое своих гранул. В тромбоцитах присутствуют плотные гранулы и альфа-гранулы. Плотные гранулы содержат в основном низкомолекулярные соединения, главным из которых является АДФ, способный активировать соседние тромбоциты, но также в них присутствует серотонин, полифосфаты и связанные с ними ионы кальция. Плотные гранулы высвобождаются при сильной активации тромбоцитов. Альфа-гранулы несут в себе в основном белки, среди которых белки системы свертывания (фибриноген, фактор фон Виллебранда, фактор V), ингибитор компонента системы комплемента C1, факторы роста и другие молекулы, способствующие тромбообразованию, либо участвующие в вазоконстрикции и ангиогенезе. Мембраны альфа-гранул содержат дополнительные интегрины и Р-селектин.

Контракция тромбоцитов – основанное на актомиозине сокращение отдельных тромбоцитов, приводящее к существенному уменьшению размера сгустка, изменение организации и жесткости сгустка, – иногда называемая «ретракцией», происходит на более поздней стадии образования тромба и происходит в результате классического взаимодействия актин/миозин. Контракция наблюдается при активации тромбоцитов различными агонистами, однако сигнальные пути, запускающие контракцию, в настоящий момент малоизучены.

1.1.3. Плазменный гемостаз

Система плазменного свертывания крови состоит из сериновых протеиназ, их кофакторов и ингибиторов, которые синтезируются в печени (витамин К, зависимые факторы свертывания) или клетками эндотелия. Итогом работы системы является фибриновый сгусток, представляющий собой полимерный гель, в сети которого удерживается плазма крови. Фибрин образуется из фибриногена путем отщепления фибринопептидов А и В, тем самым открывается доступ к сайту связывания с другими молекулами фибрина. Фибрин представляет собой длинную вытянутую молекулу. Обратимое связывание между молекулами фибрина происходит по принципу голова-к-середине. Тем самым образуются протофибриллы, которые в дальнейшем латерально соединяются с другими протофибриллами и образуют фибриновые нити. Далее происходит поперечная сшивка нитей с помощью фактора XIII (фXIII) – трансглутаминазы, которая делает кроссшивки между молекулами фибрина и затрудняет его лизис. Сам фибриновый сгусток является активным участником свертывания, так как способен взаимодействовать с тромбоцитами (которые прочно связываются с фибрином через те же рецепторы, что и с фибриногеном), специфически связывать факторы свертывания (в первую очередь тромбин и фактор VIII (фVIII)), многочисленные адгезионные белки (начиная с ФВ), а также связывать практически все компоненты системы фибринолиза и регулировать скорость фибринолитических реакций.

Сигналом для активации свертывания является контакт крови с трансмембранным белком – тканевым фактором. Этот белок присутствует на мембранах всех клеток организма, за исключением клеток крови и клеток внутреннего слоя. Детектором повреждения выступает фактор VIIa (фVIIa), активный сайт которого не может полноценно функционировать сам по себе. ФVIIa становится способным к протеолизу только при контакте с тканевым фактором (ТФ), их комплекс представляет собой полноценный фермент, называемый внешней теназой.

Практически все ключевые реакции свертывания проходят на отрицательно заряженных мембранах, предоставляемых преимущественно активированными тромбоцитами и микровезикулами. Белки свертывания (например, фермент фактор Ха (фХа) и субстрат протромбин) связываются с мембранами и затем формируют на мембранах комплексы, в которых и происходит катализ.

Основная часть системы свертывания крови представляет собой каскад – совокупность ферментов, активирующих друг друга (рисунок 1Б). Каскад

свертывания имеет четыре основные ступени. Факторы свертывания (тромбин (он же IIa), VIIa, Ixa, Xa, Xia) представляют собой родственные сериновые протеиназы химотрипсинового типа. Тромбин производится из протромбина под действием фXa, который производится из неактивного предшественника фактора X (фX). На этом уровне происходит основная физиологическая активация: фX может активироваться главным активатором свертывания, комплексом фактора VIIa и тканевого фактора. Альтернативно он может активироваться фактором Ixa (фIXa), который в свою очередь активируется либо тем же комплексом VIIa-ТФ, либо фактором Xia (фXIa), который может активироваться тромбином.

Большинство реакций каскада свертывания не просто протекает на мембранах, для полноценного функционирования им необходимы дополнительные кофакторы, которые образуются в ходе самого процесса свертывания. Так, активация протромбина фXa ускоряется на порядки в присутствии фактора Va (фVa), который образуется из своего неактивного предшественника фактора V (фV) под действием тромбина и, возможно, фактора Xa. Это первая положительная обратная связь. Комплекс фXa и фVa, который собирается на мембране и активирует протромбин гораздо быстрее самого фXa, называется протромбиназа. Аналогичным образом формируется вторая положительная обратная связь. Активация фX фактором Ixa ускоряется при наличии фVIIIa, образуемого из фVIII под действием тромбина и фXa; комплекс Ixa-VIIIa называется комплексом внутренней теназы. Факторы V и VIII принадлежат к совершенно иному семейству белков, нежели остальные; их ближайшими родственниками являются медь-связывающий белок плазмы церулоплазми и гефестин. Они не обладают ферментативной активностью и только модулируют работу ферментов. Механизмы ускорения производства продукта реакции называются положительными обратными связями – продукт реакции активирует компоненты системы, которые, в свою очередь, ускоряют наработку этого продукта. Третья положительная обратная связь в каскаде свертывания – активация фактора XI тромбином. Четвертая положительная обратная связь – активация фактора VII тромбином и фактором Xa.

Положительные обратные связи наделяют систему несколькими важными качествами: пороговым ответом по отношению к уровню активации (способность игнорировать малые сигналы, но отвечать полной мощью при превышении какого-то значения), взрывной динамикой по времени (медленно раскручивается, а потом резко переходит к максимальному ответу), автоволновым распространением в пространстве. Для реализации этих качеств надо также включить в систему ингибиторы. В настоящее время есть экспериментальные свидетельства in vitro, что в каскаде свертывания активация фV важна для порога и взрывного ответа [7], в то время как распространение в пространстве регулируется активацией фVIII [8] и фXI [9].

В системе свертывания также присутствуют белки-ингибиторы, способные связывать протеиназы и блокировать их активный сайт. Они инактивируют каждый фермент на каждой ступени каскада и необходимы для предотвращения случайного срабатывания системы. Важнейшим ингибитором свертывания является антитромбин (АТ), белок из семейства серпинов

с широкой специфичностью против ферментов свертывания. Он вносит не менее 50% вклада в инактивацию тромбина, но также способен в той или иной степени инактивировать все остальные ферменты каскада. Вторым важнейшим ингибитором свертывания является TFPI – ингибитор пути тканевого фактора. Это многодоменный ингибитор типа Куница, который одним доменом связывается с фактором Ха, а вторым – с комплексом VIIa-ТФ. При этом второй домен работает только при условии того, что первый связал свою мишень. Другие ингибиторы свертывания – альфа2-макроглобулин, альфа1-антитрипсин, альфа2-антиплазмин, кофактор гепарина II, ингибитор протеина С (ПС), протеин Z и протеин Z-зависимый ингибитор.

В каскаде свертывания существует петля отрицательной обратной связи – путь протеина С. Протеин С – сериновая протеиназа, которая активируется тромбином (образуется активная форма аПС) и в своей активной форме производит несколько разрезов в факторах Va и VIIIa, тем самым «выключая» их. Для фактора Va это единственный известный механизм инактивации, в то время как фактор VIIIa также способен терять активность вследствие спонтанной диссоциации. Для полноценной активации протеина С тромбином требуется кофактор тромбомодулин (ТМ), экспрессируемый на здоровой стенке сосуда. Данные in vitro указывают на то, что путь протеина С может лимитировать распространение сгустка в пространстве [8,9].

Еще одним важным компонентом системы свертывания является контактный путь активации свертывания. Фактор свертывания XII способен активироваться при контакте с отрицательно заряженной поверхностью. В контактном пути свертывания также задействованы фермент калликреин и высокомолекулярный кининоген, которые связаны с фактором XII сложной системой обратных связей. Фактор XIIa может активировать фактор XI, тем самым присоединяясь к верхушке каскада свертывания. До сих пор не ясна роль этого пути в свертывании. Пациенты с дефицитом фактора XII реже страдают от тромбозов, активация свертывания по контактному пути является важной частью артериального тромбоза, венозного тромбоза, а также практически всех реакций организма на биоматериалы и активации системы гемостаза при экстракорпоральной оксигенации.

1.1.4. Фибринолиз

Разрушение фибринового сгустка реализуется системой фибринолиза. Она представляет собой каскад реакций из сериновых протеиназ (рисунок 1В). Ключевой протеиназой фибринолиза является плазмин, осуществляющий разрезы в молекуле фибрина. Плазмин (ПН) образуется из своего предшественника плазминогена (ПГ) под действием двух активаторов плазминогена, тканевого (ТПА) и урокиназного (УПА). Эти молекулы с очень коротким временем жизни присутствуют в кровотоке в крайне низких концентрациях. Вероятно, они секретируются локально по мере репарации ранения, но детали этого процесса не изучены.

Тканевый активатор плазминогена, в отличие от урокиназного, способен связываться с фибрином и резко ускорять производство плазмина в его присутствии. Активность урокиназного активатора также нельзя назвать

полностью независимой от фибрина, поскольку на практике плазмин в отрыве от фибрина является крайне короткоживущим. Поэтому по факту только в присутствии фибринового сгустка активация плазминогена в плазмин может происходить в заметной степени.

В системе фибринолиза технически также присутствуют обратные связи: плазмин способен расщеплять свои активаторы, переводя их в двухцепочечную форму. Значимость этих обратных связей пока не ясна.

Все активные протеиназы фибринолиза регулируются белками-ингибиторами, главными из которых являются альфа2-антиплазмин (АП, который как раз делает время жизни активного плазмина крайне коротким) и ПАИ-1 (ингибитор активатора плазминогена), который определяет время жизни активаторов плазминогена в плазме крови.

Регуляция процесса фибринолиза происходит также со стороны свертывания крови. Тромбин активирует два фермента: фXIII и ТАФИ (тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза) – карбоксипептидазу, которая отрезает у фибрина карбокси-терминальные остатки лизина, необходимые для связывания плазминогена и его активаторов с фибрином. Оба процесса делают фибриновый сгусток более устойчивым к лизису, по мере того как концентрация тромбина повышается. В настоящий момент нет понимания, зачем нужно иметь два таких механизма с дублирующим смыслом. Фактор XIII представляется жизненно важным, так как его дефицит ведет к кровотечениям. При этом присутствие ТАФИ не может компенсировать фактор XIII, а его отсутствие у мышей не ведет к каким-то особым кровотечениям [10].

1.1.5. Формирование фибриново-тромбоцитарного сгустка в норме

Обычно артериальный тромбоз рассматривается как белый тромб из-за его состава из агрегатов фибрина и тромбоцитов. Венозный тромбоз условно представляет собой красный тромб из-за его состава: фибрина и эритроцитов. Однако недавние данные свидетельствуют о том, что различие между красным и белым тромбами более тонкое. Оба тромба состоят из фибриновой сети и содержат одни и те же клетки крови, включая эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [11,12]. Относительное количество клеток крови в артериальных тромбах зависит от генетических (полиморфизма α-, β- и γ-цепей фибриногена и фXIII), биохимических (активации тромбоцитов и концентрации компонентов системы свертывания крови) и условий окружающей среды (кровотока и напряжения сдвига, курения, дислипидемии, возраста тромба) факторов [11–13]. Таким образом, важно отметить, что тромбоциты и система свертывания, каждый обладая собственными акторами и механизмами регуляции, в большинстве случаев работают совместно, приводя к возникновению гемостатической пробки или патологического тромба. При этом тромбоциты вступают в игру на более ранних этапах.

Еще одно принципиально важное свойство системы гемостаза – ее пространственная неоднородность (рисунок 1Г). Активация гемостаза происходит локально в месте повреждения сосуда. Индикатором повреждения стенки сосуда являются внесосудистые ткани, доступ к которым открывается для крови. Для тромбоцитов главным индикатором повреждения считаются фибриллы

коллагена, которые обнажаются при ранении, а также возможный выход АДФ из поврежденных тканей. Для свертывания крови сигналом к срабатыванию является тканевый фактор. Контакт крови с этими двумя компонентами подает сигнал о необходимости формирования гемостатической пробки. В то же время здоровый эндотелий сосудов активно секретирует антитромбоцитарные вещества и экспрессирует антисвертывающие молекулы. Таким образом, поврежденные ткани служат активатором для тромбоцитов и свертывания крови, а здоровые ткани сосудистой стенки всячески подавляют их.

Первые этапы гемостаза определяются адгезией тромбоцитов к месту ранения и друг к другу. Видимо, высокие скорости сдвига в ранах определяют физиологическую необходимость двух звеньев гемостаза: адгезия тромбоцитов улучшается с увеличением скорости потока (так как он приносит новые тромбоциты), а свертывание крови подавляется (так как поток уносит активные ферменты) [14]. Поэтому свертывание крови не может работать само по себе при высоких скоростях потока. Тромбоциты прикрепляются к поврежденной стенке, следующие слои тромбоцитов крепятся к первым, и формируется тромбоцитарная пробка. Под защитой тромбоцитов, внутри тромбоцитарного агрегата, запускается каскад свертывания крови. Тромбоциты обладают также прокоагулянтной активностью, ускоряя процессы свертывания – предоставляя свою поверхность и секретируя микровезикулы для сборки комплексов внутренней теназы и протромбиназы. Распространение фибринового сгустка, таким образом, лимитируется не столько и не только скоростью реакций каскада свертывания, сколько процессами диффузии активированных факторов от места их наработки [15].

Тромбин, в свою очередь, может активировать тромбоциты, укрепляя сгусток и индуцируя секрецию тромбоцитами проаггрегаторных веществ. Помимо усиления активации тромбоцитов, система свертывания также выполняет свою главную функцию: локально превращает плазму крови в гель путем создания полимерной сети фибрина, делая ее «нетекучей». В итоге сгусток становится прочным и стабильным до тех пор, пока не будет разрушен системой фибринолиза. Тромбоциты контрактируют, уплотняя сгусток и предположительно стягивая края раны.

Финальный гемостатический сгусток представляет собой достаточно сложную негомогенную структуру, а не просто равномерный агрегат тромбоцитов с пропиткой фибрином. Плотно упакованные регионы с сильно активированными тромбоцитами находятся в «ядре» тромба, более «рыхлые» регионы слабо активированных тромбоцитов – на периферии тромба. Высвобождение плотных гранул принципиально важно для активации тромбоцитов на небольшом удалении от поврежденной области. Альфа-гранулы и прокоагулянтные тромбоциты необходимы для образования фибрина и укрепления тромба.

1.2. Патофизиологические нарушения гемостаза: тромбоз

В 1856 г. Вирхов постулировал изменение гиперкоагуляции крови как один из патологических механизмов, который может привести к тромбозу. В настоящее время термин «гиперкоагуляционное состояние» используется

как синоним предтромботического состояния, несмотря на то, что у большинства пациентов с гиперкоагуляцией никогда не разовьется тромбоз. Генетические мутации, ответственные за наследственную гиперкоагуляцию, в основном изучались в семьях с высокой частотой тромботических проявлений [16]. Приобретенные заболевания также могут приводить к изменениям свертываемости, которые могут предрасполагать к тромбообразованию. Таким образом, тромбофилию можно определить как наследственную или приобретенную аномалию гемостаза, предрасполагающую больных к венозному и/или артериальному тромбозу [17,18].

Наследственная тромбофилия – это генетическая предрасположенность к развитию венозной тромбоэмболии (ВТЭ) (таблица 1). Наиболее частыми причинами являются фактор V Лейдена (FVL) и мутация гена протромбина G20210A, на которые приходится от 50% до 70% диагностированной генетической тромбофилии. Менее частые, но более тяжелые дефекты АТ, ПС и протеина S (ПS) составляют большую часть оставшихся случаев диагностированной генетической тромбофилии [19]. Совсем недавно были идентифицированы новые генетические дефекты, ответственные за тяжелую тромбофилию, а именно псевдогомозиготность по устойчивости к активированному протеину С, гиперфункциональному фактору IX Падуя и устойчивости к АТ. И последнее, но не менее важное: принадлежность к системе групп крови АВО является наиболее распространенным генетическим фактором риска ВТЭ [20]. Существует большое количество семей (около 30-40%) с симптоматической тромбофилией, в которых не выявлено ни одного из известных наследственных состояний. Эта необъяснимая тромбофилия, скорее всего, связана с генетическими мутациями, которые до сих пор неизвестны.

Таблица 1. Повышенный тромботический риск при наследственной и приобретенной тромбофилии (воспроизведено с модификациями из [19]

Тромбофилия		**Относительный риск первичного ВТЭ**
Название	**Механизм действия**	
Наследственная тромбофилия		
Фактор V Лейден Гетерозигота Гомозигота	Мутированная форма фV, с которой не может нормально связываться с ПС.	 3-7x 80x
Мутация протромбина G20210A Гетерозигота Гомозигота	Мутация гена протромбина (G20210A) – замена гуанина на аденин в положении нуклеотида 20210 (rs1799963) в 3'-нетранслируемой области – повышает уровень протромбина в плазме.	 2-3x 5x
Двойная гетерозигота (FVL и протромбин G20210A)		6x
Дефицит АТ	Недостаточное ингибирование тромбина, фIX, фX и фIX и аXII	5x
Дефицит ПС	Недостаточное ингибирование фV и фVIII	4-6,5x

Дефицит ПS	ПS – кофактор ПС, усиливающий его активность	1-3х
Фактор IX Падула	фIX Падула представляет собой мутантный FIX с заменой лейцина на аргинин в положении 338 (FIX-R338L), имеет 8-кратно повышенную активность.	10х
Резистентность к АТ	Мутантный протромбин (миссенс-мутация p.Arg596Leu) имеет более низкую активность, чем протромбин дикого.	2-3х
Не нулевая группа крови	Антигены А и В добавляются к специфическим Н-олигосахаридам фактора Виллебранда с помощью ферментов гликозилтрансфераз, что приводит к повышению уровня этого белка в плазме и, опосредованно, к повышению уровня фVIII. Изменения в составе сахаров ФВ влияют на скорость расщепления протеазой ADAMTS-13, расщепляющей ФВ.	2х
фVIII ≥ 150 МЕ/дл		3-5х
фIX ≥ 129 МЕ/дл		2,3х
фXI≥121 МЕ/дл		2х
Приобретенная тромбофилия		
Антифосфо-липидный синдром	Выработка антифосфолипидных антител и их связывание с бета-2-гликопротеином I на клеточных поверхностях приводит к активации экспрессии Е-селектина и ТФ, подавлению активности TFPI, нарушению работы активированного ПС, снижению активности ТПА	3-10х
Гипергомо-цистеинэмия	Генетические факторы включают мутации в генах N5-метилтетрагидрофолатредуктазы (термолабильный вариант MTHFR) и цистатионин-β-синтазы. Приобретенные состояния включают дефицит фолиевой кислоты, витамина B12 или B6, гипотиреоз, псориаз, хроническую почечную недостаточность, воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит, трансплантацию органов, антифолиевые препараты. Механизмы действия на гемостаз разносторонни и включают в себя повышенную активацию тромбоцитов, повышение концентрации факторов свертывания и снижение концентрации ингибиторов.	1,5-3х

Каждый из вышеупомянутых тромбофилических признаков способствует увеличению тромботического риска. В целом наследственная тромбофилия увеличивает относительный риск развития ВТЭ примерно в 4-30 раз. Наибольшая частота наблюдается у носителей дефицита АТ. Легкая тромбофилия (гетерозиготы по FVL или мутации гена протромбина 20210A) увеличивает риск ВТЭ в 2-7 раз.

Термин тромбофилия также включает гиперкоагуляционные состояния, вызванные приобретенными нарушениями гемостаза. Приобретенные нарушения могут способствовать протромботическому состоянию за счет повышения концентрации факторов свертывания, снижения концентрации антикоагулянтов, провоспалительных/аутоиммунных механизмов, а также множественных изменений гомеостатической регуляции свертывания крови. Основными приобретенными нарушениями, связанными с тромбофилией,

являются синдром антифосфолипидных антител, гипергомоцистеинемия, временное/постоянное повышение уровня прокоагулянтных факторов и, наконец, снижение уровня естественных антикоагулянтов. Высокие уровни факторов свертывания VIII, IX, X, XI и фибриногена могут увеличить риск ВТЭ и поэтому должны быть включены в число тромбофилических нарушений. Однако генетическая основа повышенных уровней этих прокоагулянтов известна лишь частично.

ВТЭ можно рассматривать как многофакторный процесс, что означает, что один фактор риска (например, гетерозиготный FVL) обеспечит элемент риска, который вряд ли сам по себе вызовет тромбоз, но дополнительный фактор риска (например, хирургическое вмешательство) может служить триггером для возникновения явного тромбоза (таблица 2). Таким образом, взаимодействие между генетическими и приобретенными факторами риска следует учитывать для определения общего протромботического профиля пациентов.

Таблица 2. Тромботический риск при приобретенной тромбофилии и основные гиперкоагуляционные изменения путей свертывания (воспроизведено с модификациями из [19]

Приобретенная тромбофилия	**Относительный риск первичного ВТЭ**	**Изменения гемостаза**
Хирургическое вмешательство	1,7-2,8x	Экспозиция ТФ ↓ АТ ↑ ПАИ I
Травма	3-5x	↑ фибриноген, фVII, фVIII, фX, ФВ ↓ ПS Резистентность к аПС
Беременность	5-50x	↓ ПS ↓ TFPI
Заместительная гормональная терапия эстрогеном и прогестероном	2-9x	Экспозиция ТФ ↑ факторов свертывания ↓ ингибиторов
Онкозаболевания	4-7x	Активация тромбоцитов ↑ факторов свертывания ↓ ПS Резистентность к аПС ↑ генерация тромбина
Миелопролиферативные новообразования	3x	↑ фрагмены протромбина 1+2 ↓ ТПА
Длительная иммобилизация	2-4x	↑ агрегация тромбоцитов

1.2.1. Послеоперационные состояния

Операция является самостоятельным риск-фактором развития тромбоза. Из-за риска геморрагических осложнений, которые могут возникнуть во время тромбопрофилактики после оперативного вмешательства, необходимо тщательно оценить соотношение риска и пользы антитромботической терапии в качестве первичной профилактики ВТЭ, связанной с хирургическим вмешательством, у пациентов из группы риска. Для оценки риска развития

ВТЭ после хирургических вмешательств используют шкалу Caprini [21]. Положительный семейный анамнез ВТЭ представляет собой дополнительный фактор риска независимо от того, выявлен ли конкретный тип тромбофилии, поэтому дифференциальная диагностика тромбофилии в этом случае не является принципиальной. Точно так же до сих пор нет доказательств того, что модальность и продолжительность тромбопрофилактики должны быть разными у пациентов с наследственной тромбофилией или без нее. Однако стоит упомянуть, что некоторые авторы эмпирически рекомендуют более высокие дозы гепарина (в любой форме) у пациентов с дефицитом АТ, потенциально подверженных риску резистентности к гепарину, и более длительную послеоперационную профилактику из-за наличия тяжелого тромбофилического дефекта [22]. Кроме того, заместительная терапия АТ может быть назначена, когда использование стандартной тромбопрофилактики (гепарины или прямые оральные антикоагулянты) невозможно из-за высокого риска кровотечения или у пациентов с самым высоким риском ВТЭ (например, после ортопедических или абдоминальных/тазовых операций) с наследственным дефицитом АТ, хотя дозы или продолжительность заместительной терапии до сих пор не определена [22]. Использование концентратов протеина С из плазмы также было предложено у пациентов с тяжелым дефицитом РС, подвергающихся хирургическому вмешательству [23]. Рекомендации Американского колледжа торакальных врачей предлагают использовать механическую профилактику (например, эластичные чулки или прерывистую пневматическую компрессию) в дополнение к фармакологической профилактике после общих и абдоминально-тазовых операций у лиц с высоким риском ВТЭ [24].

1.2.2. Беременность и роды

Хотя риск тромботических событий во время беременности относительно невелик, тяжесть состояния и неблагоприятное влияние на здоровье женщины и исходы беременности значительны. Риск ВТЭ у небеременных женщин составляет около 2 на 10 000 женщин. Во время беременности и в первые 6 недель после родов женщины подвергаются более высокому риску ВТЭ по сравнению с небеременными женщинами. Риск постепенно увеличивается в течение беременности, причем самый высокий риск проявляется в течение короткого периода времени (1-2 недели) сразу после родов, а затем риск снижается, примерно к 6-й неделе после родов. В целом абсолютный риск ВТЭ оказался одинаковым на протяжении всего дородового периода и периода первых 6 недель послеродового периода и обычно оценивался как 10 на 10 000 женщин [25].

Основными факторами риска ВТЭ являются тромбофилия, анамнез болезни системы кровообращения и предшествующая венозная тромбоэмболия, преэклампсия и связанные с ней расстройства, а также кесарево сечение. Чрезвычайно высокий риск ВТЭ наблюдался у женщин с ВТЭ в анамнезе, не получавших тромбопрофилактику. В целом частота ВТЭ, связанной с беременностью (в дородовом и послеродовом периодах вместе взятых), у этих женщин близка к 1000 на 10 000 женщин (10%). Отдельно для дородового

периода частота ВТЭ составляет от 400 до 600 на 10 000 женщин с ВТЭ в анамнезе. Тромбопрофилактика значительно снижает вероятность тромбоза у женщин с ВТЭ в анамнезе до 100-300 на 10 000 в дородовом периоде. Вторым по значимости фактором является тромбофилия. Частота ВТЭ в течение всего периода, связанного с беременностью (до и после родов, вместе взятых), колеблется от 200 до 400 на 10 000. Интересно, что основная доля случаев ВТЭ в послеродовом периоде связана с тромбофилией (около 40-50%). Третьим важным фактором является наличие в анамнезе болезней системы кровообращения, что дает показатели заболеваемости порядка 100-200 на 10 000 женщин при послеродовой госпитализации. Эклампсия связана с ВТЭ с частотой от 40 до 130 на 10 000 женщин во время родовой госпитализации. Пятый фактор, преэклампсия, был связан с увеличением частоты ВТЭ от 15 до 30 на 10 000 в послеродовом периоде. Тяжелая преэклампсия не меняет этот показатель во время родовой госпитализации. Это наблюдение, вероятно, указывает на то, что более тяжелая преэклампсия не связана с дополнительным риском. Шестой фактор, кесарево сечение, не может быть помещен в эту иерархию однозначно, т. к. связан с широким диапазоном риска ВТЭ, от 6 до 60 на 10000. Высокая вариабельность риска после кесарева сечения, вероятно, отражает различия в тромбопрофилактике в разных странах, предполагая, что важность кесарева сечения как фактора риска ВТЭ может зависеть от географического региона.

Хотя риски ВТЭ при преэклампсии и кесаревом сечении значительно ниже, эти факторы могут составлять соответственно до 60 и 18% из-за высокой частоты кесарева сечения и преэклампсии в популяции беременных женщины. Тромботический анамнез из-за низкой заболеваемости беременных и профилактического лечения антикоагулянтами дает лишь от 5 до 15% от общего числа случаев ВТЭ. Эклампсия является незначительной причиной, поскольку она связана только с 1% всех ВТЭ, вероятно, из-за низкой частоты эклампсии в развитых странах. Преэклампсия сама по себе не влияет на риск ВТЭ в дородовом периоде. Этот вывод, возможно, потребуется рассмотреть в следующих редакциях руководящих принципов. Тем не менее следует учитывать, что преэклампсия не диагностируется до второго триместра, причем чаще всего диагноз ставится ближе к концу беременности. Это может исказить истинный риск ВТЭ при анализе данных за весь дородовой период.

1.2.3. Онкологические заболевания

ВТЭ, включающая тромбоз глубоких вен (ТГВ) и легочную эмболию (ТЭЛА), является частым осложнением у онкологических больных. Заболеваемость ВТЭ у пациентов с онкологическими заболеваниями повышена по сравнению с общей популяцией, при этом зарегистрированные ежегодные показатели составляют от 0,5% до 20%, в зависимости от конкретной онкологической субпопуляции, по сравнению с годовой частотой заболеваемости 0,1%-0,2% у пациентов без онкозаболеваний [26,27]. Кроме того, у больных онкологическими заболеваниями часто наблюдается тромбоз в необычных местах, таких как внутренностные вены или связанные с центральным венозным катетером.

Тромбоэмболия, ассоциированная с онкозаболеванием, вызывает рост заболеваемости, иногда задержку онкологического лечения, что подчеркивает сложное взаимодействие между системой гемостаза и злокачественными новообразованиями.

Антикоагулянтная терапия у пациентов с ВТЭ, связанной с раком, требует тщательного баланса между риском и пользой. Ведение пациентов с ВТЭ затруднено из-за более высокого риска повторных ВТЭ и кровотечений по сравнению с пациентами с ВТЭ без рака, а применение пероральнх антикоагулянтов может быть осложнено тяжелой тромбоцитопенией, потенциальными лекарственными взаимодействиями, тошнотой и рвотой.

1.2.4. Инфекционные заболевания

Тромбоз является распространенным последствием инфекции, которое связано с неблагоприятным исходом для пациента. Тем не менее механизмы, с помощью которых тромбоз, связанный с инфекцией, индуцируется, поддерживается и разрешается, плохо изучены, как и вклад, который тромбоз вносит в контроль хозяина над инфекцией и распространением патогенов. Ключевым отличием инфекционно-ассоциированного тромбоза от тромбоза при других обстоятельствах является более сильный воспалительный компонент, обусловленный присутствием возбудителя и его продуктов. Это воспаление запускает активацию тромбоцитов, что может сопровождаться повреждением эндотелия, что приводит к отложению фибрина и образованию тромбов. Этот процесс часто называют тромбо-воспалением.

Особняком среди инфекций, приводящих к ВТЭ, находится COVID-19. Частота ВТЭ при COVID-19 составляет 20% пациентов, частота инсульта – 3% [28]. Наблюдалась необычно высокая частота ТЭЛА, а частота ВТЭ была значительно выше у тяжелобольных пациентов, госпитализированных в отделении реанимации и интенсивной терапии, по сравнению с пациентами, госпитализированными в обычные палаты. Что наиболее важно, у многих пациентов развились тромботические эпизоды, несмотря на профилактическое применение антикоагулянтов в стандартных или более высоких дозах. Несколько исследований предполагают значительную активацию свертывания крови при тяжелой инфекции COVID-19, которая, вероятно, связана с устойчивым воспалительным ответом из-за высвобождения цитокинов, вызванного инвазией вируса. Тромбоз легочных сосудов, по крайней мере частично, может быть результатом тяжелой гипоксии, так как гипоксия является сильным стимулятором коагуляции [29]. Значительная воспалительная реакция у пациентов с тяжелой инфекцией COVID-19 может увеличить вероятность тромбоэмболии и, в свою очередь, объяснить высокую частоту ВТЭ, особенно у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии. Существующие данные свидетельствуют о том, что COVID-19 имеет более высокий риск тромбообразования по сравнению с пациентами, поступившими в отделение интенсивной терапии по другим причинам [30]. По-видимому, тромбоз, будь то макро- или микрососудистый, является результатом тяжелой воспалительной реакции, вызванной SARS-CoV-2, последующей эндотелиальной дисфункцией и прокоагулянтной средой, и, таким

образом, устранение воспаления в сочетании с рациональным применением антикоагулянтов может быть предпочтительным подходом.

1.2.5. Клональный тромбоцитоз

Повышенное количество тромбоцитов (более 500 тыс/мкл) при эссенциальной тромбоцитемии и других миелопролиферативных заболеваниях называют клональным тромбоцитозом. Клональный тромбоцитоз ассоциирован с тромботическими нарушениями. Тромбоз крупных артерий или вен может также осложнять течение клонального тромбоцитоза. Тромбоз глубоких вен и легочная эмболия являются наиболее распространенными формами венозного тромбоза при клональном тромбоцитозе [31]. Однако для миелопролиферативных заболеваний характерны внутрибрюшные тромботические осложнения, такие как тромбоз печеночных вен (синдром Бадда-Киари) и тромбоз воротной вены. Рецидивирующие спонтанные аборты и задержка роста плода встречаются примерно в 50% беременностей у женщин с эссенциальной тромбоцитемией. Хотя степень повышения количества тромбоцитов не коррелирует с риском тромбоза, контроль количества тромбоцитов путем циторедукции снижает частоту тромбоза у некоторых пациентов. Качественные нарушения тромбоцитов и лейкоцитарная или эндотелиальная дисфункция также могут способствовать гемостатическим осложнениям миелопролиферативных заболеваний. Дополнительные факторы риска тромботических осложнений у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией включают пожилой возраст, тромбозы в анамнезе, гиперхолестеринемию и курение сигарет.

1.3. Патофизиологические нарушения гемостаза: кровоточивость

1.3.1. Наследственная кровоточивость

Кровоточивость можно разделить на наследственную и приобретенную. Наследственные нарушения свертываемости крови охватывают большое количество различных, но редких состояний, которые могут привести к повышенному риску кровотечения. Наиболее распространенными наследственными нарушениями являются болезнь Виллебранда (БВ), гемофилия А и гемофилия В. Диагноз наследственной кровоточивости требует подробного анамнеза кровотечения и проведения специализированного коагуляционного исследования.

Клинические последствия сосредоточены на проблемах спонтанной или повышенной склонности к кровотечениям, особенно в связи с инвазивными процедурами (например, хирургическим вмешательством, люмбальной пункцией). Симптомы кровотечения варьируют в зависимости от тяжести заболевания. У пациентов с тяжелой кровоточивостью при скрининговых тестах коагуляции может быть увеличено протромбиновое время (ПВ) или активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Скрининг может быть нормальным при легких формах заболевания и как таковой не исключает нарушения свертываемости крови. Конкретный диагноз ставится с помощью оценки количества и функциональной активности

факторов свертывания и генетического тестирования, если оно доступно. Нарушения функции тромбоцитов диагностируются на основании исследований агрегометрии тромбоцитов. Типы кровотечения различаются при различных заболеваниях, но в тяжелых случаях симптомы кровотечения могут накладываться друг на друга.

БВ обычно проявляется кожно-слизистыми кровотечениями (носовое кровотечение, желудочно-кишечное кровотечение, длительное кровотечение из рваных ран, меноррагия, легкие кровоподтеки). БВ можно разделить на три типа: 1-й и 3-й типы – количественные дефекты (3-й тип – тяжелый) и 2-й тип – качественный дефект; они по-разному реагируют на лечение. БВ типа 1 и некоторые БВ типа 2, скорее всего, адекватно реагируют на десмопрессин, в то время как остальным пациентам с БВ типа 2 и всем пациентам с БВ типа 3 требуется концентрат фактора фон Виллебранда (ФВ) для остановки кровотечения. Тестирование ФВ измеряет количество ФВ (антиген ФВ) и функцию (кофактор ФВ ристоцетин) для подкатегории БВ 2 типа.

Следующими наиболее распространенными заболеваниями являются гемофилия А (дефицит фактора VIII), поражающая 1 из 5000 новорожденных мальчиков, и гемофилия В (дефицит фактора IX), поражающая 1 из 25 000 новорожденных мальчиков; они наследуются Х-сцепленным образом. Гемофилия подразделяется на подкатегории по активности дефицитного фактора (легкая, > 5-40 МЕ/дл, средняя, 1-5 МЕ/дл, тяжелая, <1 МЕ/дл), что определяет тяжесть кровотечения. При легкой или умеренной гемофилии пациенты могут быть бессимптомными и иметь случайное удлинение АЧТВ. У пациентов с умеренной или тяжелой гемофилией, как правило, диагностируют в детстве, и у них могут возникать суставные или мышечные кровотечения, которые могут быть спонтанными или вызванными травмой. Женщины, которые являются носителями гемофилии, обычно не страдают значительно, но могут испытывать некоторые легкие симптомы кровотечения, такие как меноррагия, и им требуется дополнительная гемостатическая поддержка во время операции и беременности.

1.3.2. Приобретенная кровоточивость

Приобретенные нарушения свертываемости крови могут сопровождать гематологические, опухолевые, аутоиммунные, сердечно-сосудистые заболевания или заболевания печени, но иногда могут возникать и спонтанно. Они могут проявляться дефицитом одного фактора или комплексными нарушениями гемостаза.

Приобретенная гемофилия А является редким заболеванием, регистрируется до 6 случаев на миллион в год. Приобретенная гемофилия А поражает мужчин и женщин всех возрастов, но чаще встречается у пожилых людей. Средний возраст на момент постановки диагноза составляет около 70 лет. Около 30-50% пациентов имеют сопутствующие заболевания, чаще всего другие аутоиммунные заболевания или злокачественные новообразования. Около 5% случаев возникают в связи с беременностью, обычно в послеродовом периоде. Из-за своей редкости расстройство почти всегда возникает неожиданно и часто не распознается.

Структурные и функциональные изменения VWF могут привести к приобретенной БВ. Описаны различные состояния, которые могут ее вызывать: сердечно-сосудистые заболевания с повышенным напряжением сдвига (включая стеноз аортального клапана), вспомогательные желудочковые устройства и экстракорпоральная мембранная оксигенация, лимфопролиферативные заболевания, миелопролиферативные новообразования и тромбоцитоз, другие виды рака, аутоиммунные заболевания.

1.3.3. Тромбоцитопении и тромбоцитопатии

Наследственные заболевания функции тромбоцитов классифицируют в соответствии с их влиянием на различные функции тромбоцитов [32]. Наиболее изученные дефекты тромбоцитов связаны с гликопротеиновыми медиаторами адгезии (синдром Бернара-Сулье, БВ тромбоцитарного типа) или агрегации (тромбастения Гланцмана) и затрагивают комплекс GPIb/IX/V и интегрин αIIbβ3 (также называемый GPIIb/IIIa), соответственно. Другими дефектами первичных рецепторов, вызывающими специфические для агонистов нарушения агрегации тромбоцитов, являются дефициты АДФ (P2Y12) или рецептора коллагена (GPVI, α2β1). Тяжелые формы дисфункции тромбоцитов обычно связаны с дефицитом рецепторов мембраны тромбоцитов, но дефекты количества и распределения секреторных гранул также могут вызывать значительные кровотечения. Гранулярные нарушения представляют собой гетерогенную группу врожденных заболеваний, общим для которых является дефицит гранул (альфа-гранул, плотных гранул и лизосом) или их компонентов. Отдельно стоит выделить такое нарушение как цитоскелетная дисфункция (с анизотрофией тромбоцитов).

Нарушения функций тромбоцитов неразрывно связаны с проблемой их концентрации: нормальный диапазон составляет 150-450 тыс. в микролитре; тромбоцитопению диагностируют (с оговорками) при значениях менее 100 тыс./мкл, но граница клинических проблем в большинстве случаев лежит в области ниже 30 тыс./мкл. Таким образом, в среднем у человека в 10 раз больше тромбоцитов, чем необходимо. Можно предположить, что благодаря этому в значительной степени сглаживаются дефекты тромбоцитов. Это ведет к тому, что большая часть врожденных изолированных нарушений функции тромбоцитов, даже относительно серьезных, таких как тромбастении Гланцмана (отсутствие ведущего рецептора агрегации), имеет мягкий и редко угрожающий жизни фенотип кровотечений. При неизолированных нарушениях это приводит к тому, что клинически значимые дефекты функции тромбоцитарного гемостаза в подавляющем большинстве случаев оказываются комбинацией собственно дефекта тромбоцитов и снижения их концентрации.

Симптомы кровотечения у пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов включают кожно-слизистые кровотечения (носовые кровотечения, кровотечения из десен), гематомы, петехии и могут включать серьезные опасные для жизни кровотечения после операций или травм. Меноррагия часто является серьезной проблемой у женщин, и во время менархе может возникнуть сильное кровотечение. Желудочно-кишечные кровотечения являются все более частым осложнением, особенно у пациентов пожилого

возраста. Клинически нарушения тромбоцитов нельзя отличить друг от друга, поскольку у пациентов проявляются схожие симптомы кровотечения. Таким образом, комплексные диагностические исследования важны для выяснения основной причины геморрагического диатеза.

В отличие от врожденных нарушений тромбоцитов, которые встречаются редко, приобретенные нарушения функции тромбоцитов чаще встречаются в клинической практике. Их основными причинами являются лекарства и системные/гематологические заболевания. Типичными клиническими проявлениями являются кровотечение из слизистых оболочек, носовое кровотечение или поверхностное эпидермальное кровотечение, как правило, умеренной степени. В большинстве случаев молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения функции тромбоцитов, полностью не установлены, что затрудняет оптимизацию лечения пациентов.

Лекарства (антиагрегантные препараты, некоторые противовоспалительные препараты) являются основной причиной приобретенной дисфункции тромбоцитов. Нарушение функции тромбоцитов и кровотечения являются частыми осложнениями системных заболеваний (таких как острая и хроническая почечная недостаточность, хронические заболевания печени), при этом лежащие в их основе молекулярные механизмы в основном недостаточно изучены.

При различных патологических состояниях, характеризующихся тромбоцитопенией, таких как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), системная красная волчанка (СКВ) и аллоиммунизация тромбоцитами, иммунная система организма вырабатывает антитела, которые связывают и разрушают циркулирующие тромбоциты [33]. Гематологические осложнения характерны для ИТП и в основном обусловлены выраженной тромбоцитопенией. Однако у некоторых пациентов низкое количество тромбоцитов само по себе не может полностью объяснить фенотип кровотечения. Многие из антитромбоцитарных антител направлены против функционально важных поверхностных рецепторов, таких как интегрины αIIbβ3 и α2β1, GPIb/IX/V, GPIV или GPVI. Ингибирование этих рецепторов может привести к нарушению функции тромбоцитов. В случае антител против GPVI оказывается лишь умеренное влияние на количество периферических тромбоцитов, но вызывается приобретенный дефицит GPVI из-за удаления рецептора с клеточной поверхности. В отличие от ИТП, СКВ в основном представляет собой тромботическое заболевание, частично вызванное активацией тромбоцитов через Fc-рецептор RIIA. Несмотря на это, тромбоцитопения встречается нередко и в основном связана с иммуноопосредованной элиминацией тромбоцитов. Однако антитромбоцитарные антитела, обнаруженные у пациентов с СКВ, иммунологически отличаются от антител, преобладающих у пациентов с ИТП. Тромбоцитопения у больных СКВ может быть острой и тяжелой, что является маркером активного заболевания и генерализованных обострений, или легкой и более хронической, когда она связана с неактивным состоянием болезни. Помимо различий между ИТП и СКВ, ИТП может представлять собой первую фазу СКВ или может предшествовать ее клиническим проявлениям. У пациентов с СКВ также сообщалось о нарушении активации тромбоцитов, которое коррелировало с дефицитом резервного пула.

1.4. Методы профилактики нарушений свертывания и их терапии

1.4.1. Антитромботическая и антикоагулянтная терапия

Нормальный гемостаз может быть подавлен патологическими факторами, что приводит к неконтролируемому образованию тромбов и окклюзии сосудов как в артериях, так и в венах. Тромбоциты вместе с эндотелиальными клетками и циркулирующими белками системы свертывания являются важными медиаторами сосудистого гемостаза и тромбоза.

Артериальный тромбоз является причиной инфаркта миокарда (ИМ) и инсульта, тогда как венозный тромбоз (ВТ) приводит к венозной тромбоэмболии и легочной тромбоэмболии (ТЭЛА). Структурно артериальные и венозные тромбы различаются. Артериальные тромбы богаты тромбоцитами и образуются по бокам или вокруг разорвавшихся атеросклеротических бляшек. Венозные тромбы богаты фибрином и эритроцитами и могут возникать, несмотря на интактную эндотелиальную стенку. Наконец, артериальный тромбоз возникает в местах с высоким сдвиговым потоком, тогда как ВТ возникает в условиях медленного сдвигового потока.

Профилактика и лечение артериальных тромбозов осуществляется преимущественно с помощью антиагрегантных препаратов, так как в этом случае ведущую роль в развитии тромбоза отводят тромбоцитам, активно вовлекаемым в тромб на месте поврежденного эндотелия в условиях высоких скоростей сдвига. В случае ВТ используют антикоагулянты, воздействующие на плазменное свертывание. Одним из основных терапевтических подходов к лечению тромбов, блокирующих кровоток в важнейших сосудах и вызывающих ишемический инсульт или инфаркт миокарда, является введение супрафизиологических количеств активаторов фибринолиза, в основном тканевый активатор плазминогена и ее вариантов [34,35]. В таблице 3 приведены основные доступные на сегодняшний день антитромботические препараты.

Таблица 3. Антитромботические средства, используемые для лечения и профилактики тромбоза.

Класс препаратов	Препарат	Способ доставки	Время полувыведения	Антидот
Ингибиторы активации тромбоцитов				
Антагонисты рецептора P2Y12	Клопидогрел Прасугрел Тикагрелор Кангрелор	перорально перорально перорально в/в	7-8 ч 2-15 ч 7 ч 3-6 мин	Трансфузия тромбоцитов
Ингибиторы гликопротеина IIbIIIa	Абциксимаб Эптифибатид Тирофибан	в/в в/в в/в	10мин 2,5 ч 2 ч	Трансфузия тромбоцитов
Ингибиторы циклогеназы	Аспирин	перорально	2-3/15-30 ч*	Трансфузия тромбоцитов
Антагонисты PAR1 рецептора	Ворапаксар	перорально	5-13 суток	Трансфузия тромбоцитов
Ингибитор фосфадиэстеразы II	Цитостазол	перорально	11-13 ч	Трансфузия тромбоцитов

Продолжение таблицы 3.

Блокаторы захвата аденазина	Дипиридамол	перорально	40 мин/10 ч**	Трансфузия тромбоцитов
Антикоагулянты				
Антагонисты витамина К	Варфарин Аценокумарол	перорально перорально	20-60 ч 8-11 ч	Витамин К
Кофакторы АТ	Гепарин НМГ	в/в, п/к в/в, п/к	0,5-1,5 ч 2-6 ч #	Протамин
Синтетические пентасахаридные ингибиторы фХа	Фондапаринукс Идрапаринукс	в/в, п/к в/в, п/к	17-21 ч 80-130 ч	Нет
Ингибиторы тромбина	Дабигатрана этексилат Аргатробан	перорально в/в	12-17 ч 39-51мин	Нет
Ингибиторы фХа	Ривароксабан Апиксабан Эдоксабан	перорально перорально перорально	5-9ч 9-14ч 10-14ч	Андексанет альфа
Фибринолитики				
Активаторы плазминогена	Альтеплаза	в/в	5-7мин$	Нет

** альфа-фаза/бэта-фаза, ** низкая/высокая доза, # зависит от способа введения и молекулярной массы препарата, $ время полужизни ТПА*

1.4.2. Гемостатическая терапия

Лечение кровоточивости в сильной степени зависит от причины кровотечения. Так, при гемофилии А и В (дефиците факторов свертывания VIII и IX, соответственно) переливают недостающий белок (человеческий или рекомбинантный). В случае, если у пациента развивается так называемая ингибиторная форма гемофилии – появляются аутоантитела к дефицитным факторам свертывания, используют препарат активированного фактора VII (rVIIa) или более сложные комплексы, содержащие факторы свертывания II, VII, IX и X. При редких формах дефицитов факторов свертывания (II, V, VII, X и XI) применяют аналогичный подход или переливание свежезамороженной плазмы крови (СЗП). Эти нарушения относят к наследственным коагулопатиям.

Другой тип нарушений – приобретенная кровоточивость вследствие, большой кровопотери или коагулопатии потребления (процессы тромбооразования происходят столь интенсивно, что концентрация в крови белков системы свертывания и тромбоцитов не успевает восстановиться). Основной принцип лечения – восполнение дефицитных компонентов (факторов свертывания и тромбоцитов). В случае коагулопатии потребления (вследствие сепсиса, например) одновременно с гемостатической терапией проводится антикоагулянтная терапия для предотвращения дальнейшего тромбообразования.

Еще одной причиной приобретенной кровоточивости может быть передозировка антикоагулянтами или антиагрегантами при проведении антитромботической терапии. В этом случае пациентам назначают антидот

и/или проводят гемостатическую терапию. В таблице 3 приведены основные доступные на сегодняшний день гемостатические препараты.

В ряде случаев не существует вариантов сколько-нибудь эффективной гемостатической терапии. Так, при геморрагическом типе инсульта современными протоколами не предусматривается никакая направленная гемостатическая терапия. В этом случае проводят хирургическое устранение последствий, корректировку артериального давления и отменяют назначение ранее получаемых антикоагулянтных препаратов.

Еще один немаловажный аспект гемостатической терапии состоит в том, что при коррекции нарушений тромбоцитарного гемостаза переливание тромбоконцентрата в подавляющем большинстве случаев, по сути, является единственной стратегией. Однако переливание тромбоцитов имеет значительные трудностями из-за ограниченной доступности доноров, трудностей с переноской и хранением, высоким риском бактериального заражения и очень коротким сроком хранения (~ 5-7 дней). Сегодня разработано несколько вариантов искусственных тромбоцитов (липосом с гликопротеинами и фибриногеном на поверхности), однако они пока не проходили клинические испытания [36].

1.5. Лабораторная диагностика и мониторинг

Тесты гемостаза можно разделить на «функциональные», характеризующие функциональное состояние системы, «индивидуальные», характеризующие отдельные элементы системы, и «маркерные», основанные на выявлении специфических маркеров свертывания крови. Функциональные тесты можно подразделить на субглобальные (или так называемые «классические») тесты, которые характеризуют работу крупных системных компартментов, и «глобальные» тесты, имеющие тенденцию лучше имитировать реальную свертываемость крови in vivo, включая тромбоцитарную и коагуляционную. Основные характеристики тестов приведены в таблице 4, а упрощенная схема иерархии тестов гемостаза представлена на рисунке 2.

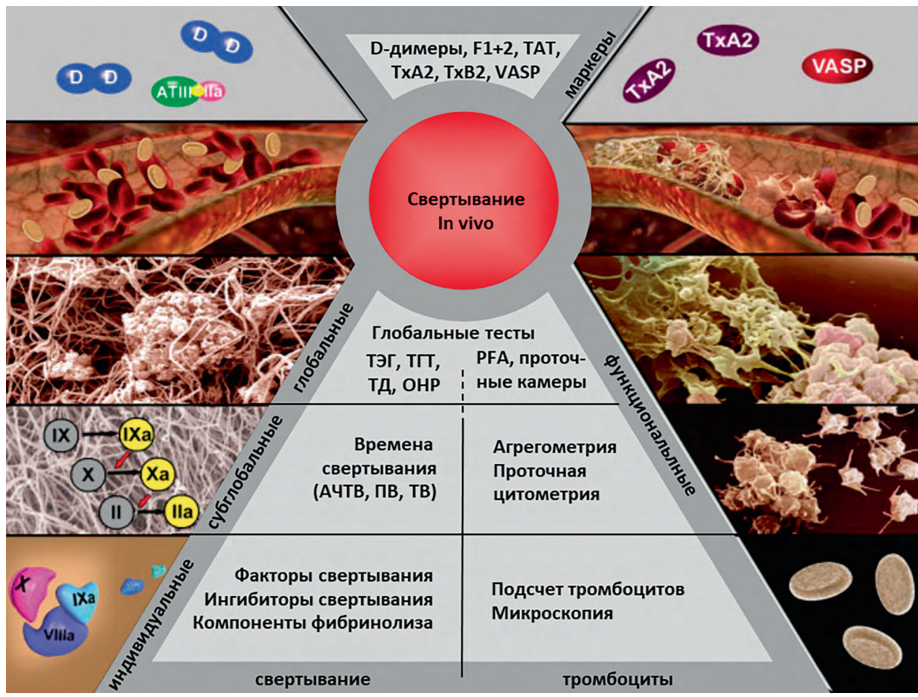

Рисунок 2. Схема классификации тестов гемостаза по охвату гемостаза: от индивидуальных (дифференциальные тесты) до субглобальных (стандартные тесты), глобальных (новые тесты) и постсобытийных (маркеры тромбоза). Восстановлено с модификациями из [37] Обозначения: TnA2 – тромбаксан А2, TxB2 – тромбоксан В2, VASP – сосудорасширяющий фосфопротеин.

Таблица 4. Характеристики тестов гемостаза

Тест	Образец	Что измеряет	Принцип
Тромбоцитарные тесты			
Агрегометрия	Кровь БТП	Агрегация	Регистрация изменения светопропускания в процессе индуцированной агрегации тромбоцитов
Проточная цитометрия	Кровь БТП	Рецепторы и маркеры активации тромбоцитов	Количественная оценка экспрессии рецепторов тромбоцитов и маркеров активации с использованием меченных флуорохромом моноклональных антител и агонистов
PFA и проточные камеры	Кровь	Адгезия Агрегация	Мониторинг действия активаторов тромбоцитов при индуцированном потоком крови образовании тромбоцитарной пробки, которая закупоривает капилляр
Измерение концентрации факторов и ингибиторов свертывания и лизиса			

Измерение концентраций основных белков системы свертывания/фибринолиза	СТП	Свертывание Фибринолиз	Измерение концентраций предшественников факторов, ингибиторов коагуляции и маркеров фибринолиза с помощью клоттинговых тестов или ИФА
Измерение концентраций маркеров активации свертывания крови (D-димер, TAT, F1+2)	СТП	Свертывание Фибринолиз	Измерение концентраций маркеров активации свертывания и маркеров фибринолиза с помощью клоттинговых тестов или ИФА
Субглобальные тесты			
АЧТВ	СТП	Свертывание	Измерение времени, необходимого для свертывания крови после активации внутреннего и общего путей
ПВ/МНО	СТП	Свертывание	Измерение времени, необходимого для свертывания крови после добавления источника тканевого фактора (активация внешнего пути)
ТВ	СТП	Свертывание	Скрининг нарушений превращения фибриногена в фибрин (гипофибриногенемия, дисфибриногенемия и наличия ингибиторов фибриноген-фибриновой реакции (гепарин, гирудин, продукты деградации фибрина и парапротеины)
Глобальные тесты			
ТЭГ/ТЭМ	Кровь СТП	Свертывание Фибринолиз	Мониторинг образования сгустков в цельной крови с использованием активаторов свертывания или тромбоцитов
ТГТ	СПТ БТП	Свертывание	Кинетика генерации тромбина, полученная путем регистрации продукта взаимодействия тромбина с синтетическим субстратом.
ОНР	СТП	Свертывание Фибринолиз	Основан на последовательной спектрофотометрической регистрации образования фибринового сгустка в присутствии экзогенного тромбина, тканевого активатора плазминогена и кальция.
ТД	СТП	Свертывание	Рост фибринового сгустка от пластины с ТФ регистрируется с помощью покадровой сьемки рассеяния света от фибриновой сети.
ТД-4D	СТП БТП	Свертывание	Рост фибринового сгустка регистрируется как в тесте ТД. Пространственная генерация тромбина происходит путем регистрации продукта взаимодействия тромбина с синтетическим субстратом.

Обозначения и сокращения: БТП – богатая тромбоцитами плазма, СТП – свободная от тромбоцитов плазма, PFA – анализатор функции тромбицитов, TAT – тромбин-антитромбин комплекс, F1+2 – фрагменты протромбина 1+2, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ/МНО – протромбиновое время/ международное нормализованное отношение, ТВ – тромбновое время, ТЭГ/ТЭМ – тромбоэластография/тромбоэластометрия, ТГТ – тест генерации тромбина, ОНР – общий потенциал гемостаза, ТД – тромбодинамика, ТД-4D – тромбодинамика-4D.

1.5.1. Функциональные тесты

Первая категория анализов включает методы, которые вызывают гемостатические процессы (либо свертывание, либо взаимодействие тромбоцитов) in vitro, чтобы имитировать условия in vivo и определить общую способность крови образовывать гемостатическую пробку.

Субглобальные (классические) тесты включают функциональные тесты, которые традиционно использовались для оценки гемостаза на протяжении десятилетий.

Основными анализами субглобального свертывания крови являются активированное АЧТВ, ПВ и тромбиновое время (ТВ). АЧТВ представляет собой время до образования сгустка, индуцированного в плазме контактным путем, и чувствительно к дефициту факторов внутреннего и общего путей. АЧТВ широко используется для мониторинга нефракционированного гепарина (НФГ) и других антикоагулянтов, включая прямые ингибиторы тромбина [38]. ПВ использует активацию по внешнему пути тканевым фактором, а также используется в качестве скринингового анализа для выявления дефицита одного или нескольких факторов свертывания крови (фибриногена и факторов II, V, VII и X). Международное нормализованное отношение (МНО) представляет собой отношение значения ПВ пациента к нормальному значению, определенному в местной лаборатории, возведенному в степень значения Международного индекса чувствительности (МИЧ) (обычно от 1,0 до 2,0) для используемого реагента и аналитической системы. ПВ/МНО широко используется для мониторинга антикоагулянтных эффектов варфарина и других антагонистов витамина К и для корректировки их дозировок. И АЧТВ и ПВ не обнаруживают какого-либо вклада циркулирующих активных факторов, микрочастиц и т. д., поскольку используемые в тестах реагенты дают мощную активацию и избыток липидов. ТВ выявляет аномалии превращения фибриногена в фибрин, на него влияют гипофибриногенемия, дисфибриногенемия и наличие ингибиторов реакции фибриноген-фибрин (гепарин, гирудин, дабигатран, продукты деградации фибрина и парапротеины)[39].

Субглобальные тесты на основе тромбоцитов, такие как агрегометрия, играют аналогичную роль для тромбоцитзависимого гемостаза. Для агрегометрии на основе светопропускания (оптическая агрегометрия) агонисты добавляются к богатой тромбоцитами плазме, и регистрируется увеличение светопропускания, когда тромбоциты начинают агрегировать. Метод недостаточно стандартизирован. Таким образом, сравнение результатов между различными лабораториями затруднено, и оптическая агрегометрия даже близко не соответствует физиологическим условиям [40]. В целом, оптическая агрегометрия изначально была разработана для оценки потенциальных наследственных нарушений функции тромбоцитов, а в последнее время – для мониторинга ответа на лечение обычными классами антитромбоцитарных препаратов. Современными реализациями агрегации цельной крови являются анализатор Multiplate® (Roche Diagnostics Limited, Соединенное Королевство), VerifyNow (Accriva Diagnostics, Калифорния, США) и некоторые другие [41].

Глобальные тесты гемостаза представляют собой новое поколение методов [42], разработанных для того, чтобы лучше имитировать условия in vivo [43] и, таким образом, быть чувствительными к более широкому спектру нарушений в системе гемостаза.

Важные глобальные тесты на основе адгезии тромбоцитов включают анализатор функции тромбоцитов (PFA) и различные проточные перфузионные камеры для видеомикроскопии. PFA-100 оценивает первичный гемостаз in vitro, измеряя время, необходимое цитратной крови, чтобы закупорить отверстие в мембране тестового картриджа, покрытого различными агонистами тромбоцитов [44]. PFA-100 фокусируется на адгезии тромбоцитов, вклад от свертывания крови не оценивается. Считается, что этот анализ является хорошим индикатором нормального гемостаза, связанного с тромбоцитами (чувствительность около 85%), но его специфичность в отношении аномалий функции, связанной с тромбоцитами, низкая, всего от 55 до 75% [45]. Проточные камеры обычно являются микрожидкостными устройствами, в которых адгезию тромбоцитов к поверхности, покрытой активатором (как правило, коллагеном), в условиях физиологического течения контролируют с помощью наблюдения под микроскопом. Использование проточных анализов для оценки гемостаза началось несколько лет назад [46]. Некоторые анализы проточной камеры на основе тромбоцитов, такие как T-TAS, также могут включать образование фибрина.

Глобальные анализы, основанные на коагуляции, многочисленны и различаются по своему дизайну. Одним из способов характеристики образования сгустков является реометрия, которая имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что ее легко применять в цельной крови. Тромбеластография (ТЭГ)/тромбоэластометрия (ТЭМ) – самый древний глобальный анализ гемостаза, при котором образование сгустка и агрегация тромбоцитов оцениваются одновременно с помощью реометрии вынужденных колебаний, и, вероятно, единственный метод, который в настоящее время стал более широко использоваться в клинической практике, несмотря на многие текущие исследования. Генерация тромбина, изобретенная в ее нынешнем виде группой Конрадом Хемкером из Маастрихтского университета [47], легшая в основу теста генерации тромбина (ТГТ), использует чувствительный к тромбину флуорогенный субстрат для определения концентрации тромбина в зависимости от времени. Кривая обычно имеет характерную колоколообразную форму. Такие параметры, как эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП, площадь под кривой образования тромбина), являются одними из наиболее широко используемых, и их корреляция с клиническим фенотипом хорошо известна, хотя вопросы стандартизации все еще существуют. В настоящее время существует множество модификаций генерации тромбина, включая несколько коммерчески доступных версий. По-видимому, образование тромбина чувствительно к различным факторам гиперкоагуляции в зависимости от конструкции, в том числе: чувствительность к факторам II, V, фибриногену, AT при высокой концентрации ТФ (13,6 пМ); к фактору XII, фибриногену, AT, TFPI при низкой концентрации ТФ (1 пМ) [48], а также к факторам VIII и IX [49]; к дефектам пути ПС при добавлении ТМ или активатора протеина С[50]; к циркулирующим ТФ при проведении

без активаторов; к липидам при проведении без добавления липидов извне [50]. Фибринолиз и использование цельной крови в настоящее время выходят за рамки доступных версий этого метода, хотя появились некоторые предварительные данные об образовании тромбина в цельной крови [51]. Общий потенциал гемостаза (OHP), основанный на повторной спектрофотометрической регистрации агрегационной кривой фибрина в бедной тромбоцитами плазме, содержащей небольшое количество экзогенного тромбина, тканевого активатора плазминогена и кальция. Общий потенциал коагуляции и общий фибринолитический потенциал являются дополнительными параметрами OHP, при этом сообщалось об исследованиях в ряде состояний гипер- и гипокоагуляции и во время лечения антикоагулянтами [41,52]. Наконец, тромбодинамика (ТД) основана на идее мониторинга пространственного образования фибрина, инициируемого иммобилизованными ТФ в плазме с помощью видеомикроскопии, так что сгусток сначала образуется на активаторе, а затем распространяется в плазму. Идея этого заключается в учете пространственной неоднородности свертывания крови. Другими словами, в том факте, что инициация и распространение свертывания крови происходят в пространственно разделенных областях [43]. В соответствии со свертыванием раны in vivo, ТФ располагается на поверхности, и распространение сгустка происходит за счет активации и диффузии фактора свертывания крови [8]. Важно отметить, что разделение фаз активации и распространения [53] делает анализ особенно чувствительным к присутствию в плазме активаторов свертывания крови, таких как циркулирующий ТФ или фактор Xia. Пространственная скорость образования сгустков указывает на общий прокоагулянтный потенциал, в то время как образование независимых от активаторов центров спонтанного свертывания крови может указывать на наличие микрочастиц и долгоживущих факторов свертывания крови [50]. Еще одна модификация тромбодинамики – тромбодинамика-4D (ТД-4D) – позволяет оценивать не только динамику роста фибринового сгустка, но и генерации и распросттранения волны тромбина [54].

1.5.2. Индивидуальные анализы

Ко второй категории методов относятся тесты, определяющие специфические параметры систем гемостаза. Типичным примером является широкая палитра подходов, направленных на определение концентраций отдельных белков с использованием методов коагуляционного или иммуноферментного мечения. Для тромбоцитзависимого гемостаза ту же функцию выполняет проточная цитометрия, которая может идентифицировать дефицит или дефекты почти всех основных гликопротеинов тромбоцитов или реакции активации, определение мультимеров ФВ и дезинтегрина и металлопротеиназы с мотивом тромбоспондина типа 1, активностью члена 13 (ADAMTS13) и др.), но они выходят за рамки настоящего обзора.

Более подробно остановимся на активно развивающемся в последнее десятилетие методе оценки функциональной активности тромбоцитов (ФАТ). Проточная цитометрия позволяет проводить анализ отдельных клеток и их компонентов с помощью антител, меченных флуоресцентным красителем. Проточная

цитометрия тромбоцитов широко используется для диагностики классических тромбоцитопатий, например при отсутствии или недостатке тех или иных рецепторов (GPIb – для синдрома Бернара-Сулье; интегрин αIIbβ3 – для тромбастении Гланцмана 1-го и 2-го типов и др.). Цитометрия без дополнительной стимуляции тромбоцитов используется как для скрининга, так и для постановки окончательного диагноза. В меньшей степени это утверждение справедливо для тех тромбоцитопатий, которые «заметны» только после активации тромбоцитов: синдром Скотта, тромбастения Гланцмана 3-го типа. В этом случае проточная цитометрия гораздо реже применяется в клинике, поскольку в данном случае выбор параметров (в первую очередь типа активации и маркеров) не обоснован ни фундаментальными данными по физиологии и патофизиологии, ни сколько-нибудь обширными клиническими испытаниями. Сегодня понятие «наследственная тромбоцитопатия» резко расширилось: сюда вошли разнообразные дефекты рецепторов и сигнализации, которые раньше не детектировались. Метод ФАТ основан на сравнении данных проточной цитометрии покоящихся и активированных тромбоцитов. В качестве активатора используется смесь агонистов (пептид, активирующий рецептор тромбина (thrombin receptor activating peptide, TRAP-6), пептид, родственный коллагену (collagen-related peptide, CRP) и $CaCl_2$). Используемые панели антител позволяют получить информацию о количестве и активности ряда интегринов, участвующих в осуществлении основных функций тромбоцита:

- PAC-1, сцепленный с флуоресцентным красителем флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), связывается с активированной формой интегрина αIIbβ3, рецептора фибриногена;
- CD42b, сцепленный с фикоэритрином (PE), связывается с GPIb, рецептором фактора Виллебранда;
- аннексин V, меченный красителем Alexa647, – это маркер фосфатидилсерина, выходящего на поверхность тромбоцитов при их активации;
- CD61-PE связывается с GPIIIa;
- CD62P-Alexa647 – с P-селектином, основным веществом α-гранул;
- мепакрин не является антителом, однако обладает собственной флуоресценцией и используется для оценки степени выброса плотных гранул [55].

ФАТ проводится в цельной крови, может быть использован для анализа образцов с низкой концентрацией тромбоцитов (например, при ИТП). Тест отражает риски кровоточивости [56] и эффекты от стимулирующих тромбопоэз препаратов [57].

В целом эти дифференциальные методы позволяют выявить конкретные проблемы (и поэтому незаменимы при исследовании изолированных наследственных нарушений гемостаза), но не дают общей картины гемостаза и просто слишком ограничены: гемостаз – слишком большая система, и многие компоненты невозможно измерить в рамках рутинной реальной практики.

1.5.3. Маркерные анализы

Последний класс коагуляционных тестов контролирует маркеры уже произошедшего тромбоза: D-димеры, тромбин-антитромбиновые (TAT) комплексы, промежуточные формы активированных белков. Эти анализы

помогают диагностировать тромбозы и тромбоэмболии и могут предсказать будущие тромботические осложнения при определенных условиях [58]. Эти анализы обычно основаны на специфических антителах.

2. Физиология эритроцитарной системы

Дыхание – важнейший физиологический процесс, необходимый для существования человека, обеспечивающий нормальное течение метаболизма. Суть дыхания заключается в потреблении кислорода из окружающей среды и выделении в среду углекислого газа. Доставку кислорода в ткани осуществляет кровь, перекачиваемая сердцем. Потребности человеческого организма в кислороде довольно велики: в сутки потребление кислорода достигает 400-600 литров, что обязывает кровь хорошо растворять кислород [59]. Основным белком крови, связывающим кислород, является гемоглобин (Hb) – белок, состоящий из четырех похожих субъединиц, каждая из которых способна обратимо связывать кислород. Таким образом, каждая молекула гемоглобина способна связать до 4 молекул кислорода, причем для такого связывания не требуется энергия. Однако раствор гемоглобина в высокой концентрации, как и всякого белка, имеет высокую вязкость, что затрудняло бы его перекачку по сосудам организма. Для этой цели существуют эритроциты, занимающие примерно 40% объема нашей крови. «Упаковка» гемоглобина в эритроциты позволяет сильно снизить вязкость крови.

Эритроцит имеет форму двояковогнутого диска диаметром около 7 μм, толщиной 1 мкм в центре и 2 мкм по ободу диска. Такой размер и форма эритроцита обеспечивают оптимальные условия для переноса и насыщения тканей кислородом. Эритроцит имеет избыточную площадь поверхности относительно его объема (отношение площади поверхности эритроцита к объему клетки, в норме примерно в 1,5-2 раза выше, чем для максимального объема, который можно поместить в эту оболочку). Это позволяет ему легко менять форму (деформироваться) [60,61]. Эритроцит меньших размеров и сферической формы имел бы меньший объем, и, соответственно, требовалось бы больше эритроцитов, что в свою очередь увеличивало бы вязкость крови. Толщина диска позволяет быстро обменивать кислород посредством диффузии по всему объему клетки. Двояковогнутая форма эритроцита обеспечивает хорошую обтекаемость, небольшое гидродинамическое сопротивление, позволяет складываться в компактные «монетные столбики», улучшая реологию крови.

Для обеспечения основной транспортной функции эритроциту необходимо долго циркулировать в кровотоке, протискиваясь через узкие капилляры и селезеночные пазухи [62], диаметр которых меньше диаметра эритроцитов в 3-4 раза. Мембрана эритроцитов нерастяжима [63], поэтому прохождение по узким капиллярам обеспечивается уникальной гибкостью и деформируемостью клеток. Деформируемость является функцией структуры белков цитоскелета, поддержания объема и отношения площади поверхности мембраны к объему клетки. Неспособность деформироваться приводит к сокращению продолжительности жизни эритроцитов.

Таким образом, для обеспечения адекватного снабжения тканей кислородом необходимо наличие в крови определенного оптимального количества эритроцитов правильной формы, с корректным объемом и структурой мембраны, содержащих хорошо связывающий и отдающий кислород белок – гемоглобин. Регуляция количества эритроцитов должна осуществляться таким образом, чтобы скорость производства новых эритроцитов приблизительно соответствовала скорости разрушения старых.

Время жизни эритроцитов в кровотоке составляет около 120 дней. Старые эритроциты утилизируются из кровотока макрофагами в селезенке. Им на замену синтезируются новые эритроциты в ходе эритропоэза в костном мозге. Регуляция эритропоэза осуществляется эритропоэтином (ЭПО), представляющим собой гликопротеиновый гормон, который стимулирует выработку эритроцитов [64]. Этот гормон естественным образом вырабатывается перитубулярными клетками почек в ответ на снижение концентрации кислорода в тканях. Парциальное давление кислорода в крови (pO_2) напрямую регулирует производство ЭПО. Чем ниже pO_2, тем выше выработка ЭПО. Гемопоэз в целом и в частности эритропоэз находятся под контролем растворимых и мембраносвязанных факторов, механизм действия которых опосредованно регулируется с помощью специфических трансмембранных рецепторов, участвующих во внутриклеточной сигнализации и активации определенных цитоплазматических молекул. Повышенная транскрипция гена ЭПО, опосредованная фактором, индуцируемым гипоксией (Hypoxia-Inducible Factors, HIF), приводит к увеличению концентрации белка ЭПО в кровотоке, который связывается с эритроидными предшественниками в костном мозге, что приводит к активации внутриклеточного сигнального каскада и синтезу новых эритроцитов.

Изменение количества эритроцитов в кровотоке говорит о наличии нарушений в системе эритропоэза либо об образовании «неправильных» эритроцитов, не удовлетворяющих перечисленным выше требованиям.

2.1. Патофизиологические нарушения: эритроцитоз

Эритроцитоз – состояние, при котором наблюдается повышенное количество эритроцитов в крови. Избыточное количество эритроцитов приводит к увеличению вязкости крови, что ведет к замедлению кровотока в сосудах, тромбозам, нарушению кровоснабжения. Эритроцитоз обусловлен либо уменьшением объема плазмы (относительный эритроцитоз), что не связано с патологиями в эритроцитарной системе, либо увеличением общего числа эритроцитов (абсолютный эритроцитоз) [65]. Абсолютный эритроцитоз может быть первичным или вторичным. При первичном эритроцитозе наблюдается молекулярный дефект эритроцитов и/или их предшественников, который возникает через ЭПО-независимый механизм [66]. Вторичный эритроцитоз, напротив, является ЭПО-зависимым, с дефектом, лежащим вне эритроцитов. Однако гемоглобины с высоким сродством к кислороду включены в эту группу, несмотря на их внутриэритроцитарные молекулярные дефекты, затрагивающие ген глобина, поскольку эритроцитоз в них в конечном счете возникает в результате увеличения ЭПО в крови из-за истощения

кислорода на уровне тканей. Как первичный, так и вторичный эритроцитоз можно подразделить на врожденный или приобретенный.

Первичный эритроцитоз. Врожденная форма первичного эритроцитоза представляет собой заболевание, известное как первичная семейная и врожденная полицитемия (primary familial and congenital polycythemia, PFCP). Заболевание вызвано мутациями в гене, кодирующем рецептор эритропоэтина (EPOR). Эти мутации приводят к гиперчувствительности клеток-предшественников эритроидного ряда к эритропоэтину [67]. Наследование происходит по аутосомно-доминантному типу, хотя также сообщалось о спорадических случаях, возникающих из-за мутаций *de novo*. Диагноз PFCP ставится при наличии у человека изолированного эритроцитоза при отсутствии спленомегалии, уровне ЭПО в сыворотке ниже лабораторного референсного диапазона, нормальном сродстве гемоглобина к кислороду и наличии гиперчувствительности костномозговых эритроидных предшественников к ЭПО. Ген, кодирующий EPOR, расположен на хромосоме 19p13.2 и содержит 8 экзонов. Все мутации, описанные на сегодняшний день, были обнаружены в экзоне 8. Мутации приводят к укорочению молекулы EPOR за счет потери цитопразматического карбокси-терминального конца рецептора. Это усиливает его функцию, т. к. отсутствующий конец рецептора содержит сайты связывания с отрицательными регуляторами передачи сигнала (SHP1, SHIP1, SOCS, CIS).

Приобретенной формой первичного эритроцитоза является истинная полицитемия (Polycythemia vera (PV)). PV возникает в результате миелопролиферативного новообразования в костном мозге, характеризующегося повышенной пролиферацией всех ростков гемопоэза. Заболевание не передается по наследству, дебютирует во взрослом возрасте. В 95-98% случаев истиной полицитемии обнаруживается мутация V617F Янус-киназы второго типа (Janus-kinase 2, JAK2) [68]. Цитоплазматическая тирозинкиназа JAK2 при связывании с лигандом активирует и затем фосфорилирует преобразователи сигнала и активаторы транскрипции (signal transducers and activators of transcription, STAT)[69]. Мутация пути JAK2 приводит к независимой от цитокинов активации пути, ведущей к неконтролируемому росту числа эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов/моноцитов. Большое патогенетическое значение в развитии заболевания имеет мутация V617/F в 12 экзоне гена, кодирующего JAK2, в 1849 позиции с заменой гуанина на тимин, что приводит в белке JAK2 к замене фенилаланина на валин [70]. В результате меняется структура белка JAK2, что приводит к повышению его активности и, как следствие, к активации пролиферации и накоплению клеток зрелого миелоидного ряда. Хотя указанная мутация является при данном заболевании преобладающей, были идентифицированы также дополнительные мутации в ферменте, его рецепторе или на других уровнях сети, которые приводят к активации пути JAK2-STAT [71].

Распространенность PV в США составляет от 44 до 57 случаев на 100 000 населения [72]. В России эпидемиологических проспективных популяционных исследований заболеваемости PV не проводилось. В Санкт-Петербурге ретроспективный анализ десятилетнего опыта показал первичную заболеваемость PV, равную 0,83 случая на 100000 населения в год. В США первичная

заболеваемость на 100000 населения в год составляет 0,95 случаев [73].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выделяет три главных критерия для диагностики истиной полицитемии [74], которые включают уровень гемоглобина, гематокрита и количестве эритроцитов в крови, биопсию костного мозга, демонстрирующей гиперклеточность с трехлинейным ростом с плеоморфными зрелыми мегакариоцитами и наличие мутации в экзоне 12 гена, кодирующего JAK2.

Целями лечения PV являются снижение риска артериальной и венозной тромбоэмболии, минимизация симптомов и сведение к минимуму рисков трансформации в острый лейкоз и пост-миелофиброз [65]. Тромбоз при PV является распространенным явлением: до 15% пациентов с недавно диагностированной PV имеют в анамнезе артериальную или венозную тромбоэмболию. Пациентам с низким риском тромбоэмболии (пациенты младше 60 лет с отсутствием тромбозов в анамнезе) назначают ежедневные низкие дозы ацетилсалициловой кислоты и флеботомию (кровопускание) для достижения целевого значения гематокрита менее 0,45. Пациентам с высоким риском тромбоэмболии назначают циторедуктивную (снижающую количество клеток) терапию в дополнение к терапии низкими дозами ацетилсалициловой кислоты и флеботомии. Для всех больных PV в рекомендации входит физическое удаление избыточной массы циркулирующих эритроцитов (кровопускание). В качестве циторедуктивной терапии используют препараты гидроксикарбамида, рекомбинантного α-интерферона и бусульфан. Перспективными препаратами для лечения больных PV являются селективные ингибиторы JAK 2. Один из таких ингибиторов (руксолитиниб, ингибитор JAK1/2) хорошо себя зарекомендовал в исследованиях в сравнении с гидроксикарбамидом и зарегистрирован для лечения пациентов с PV с резистентностью к терапии гидроксикарбамидом [75]. Предметом исследований для применения у пациентов с PV в настоящее время являются новые, более селективные ингибиторы JAK2 (гадотиниб), ингибиторы гистондеацетилазы MDM2 (идасанутлин) и теломеразы (имителстат) [76]. Миметики гепсидина (например, PTG-300), ограничивающие доступность железа для предшественников эритроцитов, предлагают интересную альтернативу терапевтическому кровопусканию и могут произвести революцию в лечении пациентов с PV. Ожидаются результаты более крупных рандомизированных исследований для подтверждения эффективности этих препаратов, наблюдаемой ранее в клинических исследованиях фазы 1 и 2.

Вторичный эритроцитоз. Как уже было сказано выше, вторичный эритроцитоз возникает как результат повышенного уровня эритропоэтина в кровотоке. Вторичная полицитемия с высоким уровнем ЭПО также может быть врожденной или приобретенной.

Обнаружено более 100 мутаций в генах HBA и HBB, кодирующих α и β-глобины, приводящих к увеличению сродства гемоглобина к кислороду и снижению доставки кислорода к тканям, что приводит к компенсаторной полицитемии [66]. Эти мутации влияют на кооперативное связывание между субъединицами глобина или препятствуют связыванию 2,3-дифосфоглицерата (2,3-DPG). Такие мутации преимущественно наследуются и вызывают доброкачественную полицитемию. Около двух третей этих мутаций не приводят к клинически значимому эритроцитозу.

Очень редким заболеванием является дефицит бисфосфоглицератмутазы (BPGM) в эритроцитах. Данный фермент ответственен за каталитический синтез 2,3-дифосфоглицерата из 1,3-дифосфоглицерата. 2,3-DPG присутствует в эритроцитах в высоких концентрациях. Он связывает гемоглобин и аллостерически изменяет его конфигурацию, тем самым модулируя его способность связывать кислород. Дефицит BPGM приводит к снижению уровня 2,3-DPG, что повышает сродство гемоглобина к кислороду и, как следствие, к снижению доставки кислорода к периферическим тканям и компенсаторной полицитемии. До сих пор сообщалось лишь о нескольких случаях эритроцитоза, вызванных дефицитом фермента BPGM [66].

Обнаруженные на сегодняшний день мутации в генах, регулирующих кислородочувствительный путь в тканях, связаны с воздействием на фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) и активирующий экспрессию более 200 генов (в том числе эритропоэтина), участвующих в клеточном, локальном и системном ответе на гипоксию. Контроль деградации субъединиц этого фактора имеет регуляторное значение для эритропоэза. Белки домена пролил-4-гидроксилазы (PHD) PHD1, PHD2 и PHD3 гидроксилируют HIF-α с использованием молекулярного кислорода. Гидроксилированный HIF-α становится мишенью белка фон Хиппеля-Линдау (pVHL) для убиквитин-опосредованной деградации. Таким образом, при достаточной концентрации кислорода фактор HIF гидроксилируется и деградирует, при гипоксии – активируется. Мутация гена белка VHL (c.598 C>T), вызывает структурное изменение в этом белке, так что его связывание с субъединицей HIF-2α ослабляется. В свою очередь, HIF-1α стабилизируется, увеличивается секреция ЭПО, и возникает эритроцитоз. В 2002 г. впервые в Чувашской автономной республике России была обнаружена мутация гена белка VHL, вызывающая полицитемию. В этом регионе эритроцитоз известен как эндемическое заболевание с 1970-х годов. Его называют чувашской полицитемией (ЧП). Исследователи [77] сообщили, что приводит к этому заболеванию гомозиготная мутация гена белка VHL [VHL:c.598C>T (p.Arg200Trp)]. Впоследствии эта мутация была обнаружена у людей из Европы, США, Африки и Азии [78].

Также были обнаружены мутации в гене *EGLN1*, кодирующем PHD2, приводящие к эритроцитозу [66]. Эти мутации приводят к неспособности PHD2 гидроксилировать HIF-α, тем самым предотвращая его деградацию с помощью pVHL. Это приводит к димеризации HIF, активации ЭПО и эритроцитозу. Остальные известные мутации приведены в таблице 5. В целом зарегистрировано довольно мало случаев с подобными врожденными нарушениями.

Врожденная метгемоглобинемия является редким заболеванием, которое зачастую клинически не диагностируется [79]. Она возникает в результате дефицита метгемоглобинредуктазы, фермента в норме восстанавливающего метгемоглобин в гемоглобин. Окисление железа в гемоглобине в трехвалентное состояние (Fe^{3+}) приводит к образованию метгемоглобина, который имеет высокое сродство к кислороду, что, соответственно, может приводить к эритроцитозу, опосредованному гипоксемией [80]. Эритроцитоз в таких случаях непостоянен и обычно протекает в легкой форме. Метгемоглобин представляет собой естественный окисленный метаболит гемоглобина,

который в норме образуется в организме, однако не превышает при этом физиологического уровня 1-2%.

Метгемоглобинемия, не связанная с дефицитом метгемоглобинредуктазы, может также развиться в результате некоторых видов острых химических отравлений (анилиновые красители, парацетамол, перманганат калия и др.).

Первым шагом к постановке диагноза врожденного эритроцитоза является исключение вторичных причин повышения ЭПО или PV [66]. Окончательный диагноз может быть поставлен только после того, как секвенирование выявит мутацию в одном из генов-кандидатов. Уровни ЭПО могут служить ориентиром для принятия решения о том, какой ген секвенировать первым. Приобретенный вторичный эритроцитоз встречается чаще, чем врожденный, и связан с нормальным ответом эритропоэза на повышенную продукцию ЭПО (при гипоксии, вызываемой внешними факторами, например некоторыми заболеваниями, приемом определенных лекарственных средств или наличием опухоли, продуцирующей ЭПО). Причины приобретенного вторичного эритроцитоза приведены в таблице 5.

Лечение приобретенного вторичного эритроцитоза направлено на основную причину возникновения повышенного уровня эритропоэтина. По уровню эритропоэтина в сыворотке можно дифференцировать первичный и вторичный эритроцитоз.

Таблица 5. Эритроцитоз, сводная информация.

Причины	**Конкретное нарушение**	**Следствие нарушений**	**Уровень эритропоэтина в крови**
Первичный эритроцитоз			
Врожденный			
Мутации рецептора эритропоэтина EPOR (первичная семейная и врожденная полицитемия)		Гиперчувствительность клеток-предшественников эритроидного ряда к эритропоэтину	Низкий
Приобретенный			
Мутации тирозинкиназы, запускающей эритропоэз JAK2 (истинная полицитемия)		Повышенная активность тирозинкиназы JAK2 и, как следствие, активация пролиферации и накопления клеток зрелого миелоидного ряда	Низкий
Вторичный эритроцитоз			
Врожденный			
Мутации кислородо чувствительного пути	Ген pVHL	Нарушена регуляция фактора HIF, активирующего эритропоэз при гипоксии	Нормальный или повышенный
	Ген EGLN1, кодирующий PHD2		
	Ген EPAS1, кодирующий HIF-2α		
Мутации, кодирующие α и β-глобины	Гены HBA и HBB	Повышение сродства гемоглобина к кислороду и, как следствие, гипоксемия	
Дефициты ферментов в эритроцитах	Дефицит бисфосфоглицератмутазы		
	Дефицит метгемоглобинредуктазы (Метгемоглобинемия)		

Приобретенный			
Заболевания почек [81]	Кисты почек Карцинома Трансплантация почки Гидронефроз Нефротический синдром Диффузное паренхиматозное заболевание Синдром Барттера	Продукция ЭПО почечными интерстициальными перицитами (отростчатыми клетками соединительной ткани, расположенными преимущественно по периферии стенок кровеносных сосудов) [81]	Повышенный
Солидные опухоли [82]	Гепатоцелюлярная карцинома, менингиома, гемангиобластома мозжечка, лейомиома матки, рак паращитовидной железы [82]	Продукция ЭПО опухолевыми клетками [82]	Повышенный
Причины	**Конкретное нарушение**	**Следствие нарушений**	**Уровень эритропоэтина в крови**
Лекарственные средства	Андрогенные стероиды, (тестостерон) [83]	Увеличение продукции ЭПО почками, повышение доступности железа за счет снижения уровня гепсидина, гормона, отвечающего за секвестрацию железа [84]	Повышенный
	Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера-2 (SGLT2) [85]	Увеличение продукции ЭПО почками. Точный механизм увеличения продукции ЭПО в данном случае пока не установлен [85]	
Гипоксия	Гипоксическая болезнь легких [86] Обструктивное апноэ сна [87] Нахождение в горах или другие условия, провоцирующие пониженное содержание кислорода в крови	Увеличение продукции ЭПО в ответ на гипоксию	Повышенный

2.2. Патофизиологические нарушения: анемия

Анемия – состояние, которое характеризуется гипоксемией, сопровождается снижением гемоглобина в крови и зачастую снижением количества эритроцитов. Анемия сама по себе не определяет конкретного заболевания, т. к. анемии разнообразны по этиологии, патогенезу и клинико-гематологическим особенностям. Они могут быть как самостоятельным заболеванием, так и синдромом при различных заболеваниях. По оценкам ВОЗ, во всем мире анемией страдают 42% детей в возрасте до пяти лет и 40% беременных женщин [88]. Основным маркером анемии является снижение содержания гемоглобина в единице объема крови. Границей, разделяющей норму и патологию, принято считать показатель гемоглобина <110 г/л крови [89]. Число эритроцитов – менее информативный показатель анемии и не всегда коррелирует со степенью

снижения гемоглобина. Значение анемии для организма определяется прежде всего уменьшением кислородной емкости крови, приводящей к гипоксии.

По механизму возникновения, анемии можно разделить на три большие группы:

- Анемии, обусловленные кровопотерей (посгеморрагическая анемия).
- Анемии, обусловленные повышенным разрушением эритроцитов (гемолитические).
- Анемии, обусловленные нарушениями эритропоэза (недостаточная интенсивность продукции эритроцитов).

2.2.1. Анемии, связанные с дефицитным эритропоэзом

Нарушения в системе эритропоэза могут быть первичными, то есть самостоятельными заболеваниями, возникающими непосредственно в эритроцитарной системе, или вторичными, возникающими вследствие заболеваний других органов. Нарушения могут приводить как к эритроцитозу, который описан выше, так и к анемии. Уменьшение количества эритроцитов (дефицитный эритропоэз) может возникать в результате патологий костного мозга либо в результате дефицита макроэлементов и витаминов, необходимых для созревания эритроцитов. Оба типа нарушений могут быть врожденными и приобретенными. Анемия в этих случаях возникает в результате уменьшенного количества эритроцитов в кровотоке из-за неэффективного синтеза эритроцитов. Патологии костного мозга приводят к снижению продукции одного или нескольких основных гемопоэтических клонов, что приводит к уменьшению или отсутствию гемопоэтических предшественников в костном мозге и сопутствующим цитопениям. В таблице 6 дана классификация двух этих групп заболеваний и их особенности.

Таблица 6. Дефицитный эритропоэз. Сводная таблица.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Патологии костного мозга			
Апластическая анемия (трехростковая) 1:100 000–160 000 человек [90]	Врожденная (анемия Фалькони)	Мутации в генах FANC, ответственных за белки, участвующие в репарации ДНК, включая межцепочечные сшивки (ICL)	Панцитопения, предрасположенность к злокачественным новообразованиям, включая лейкемию, плоскоклеточный рак и аномалии развития, положительный результат теста на хрупкость хромосом
2-14):1 000 000 в год, в Азии регистрируется более высокая заболеваемость, чем в Европе	Приобретенная	Аутоиммунное заболевание, вызываемое Т-клетками, специфичными к гемопоэтическим стволовым клеткам+ генетические дефекты (полиморфизмы генов, кодирующих HLA, TNF- α [91,92] , INF-ɣ и генов IL-6. Возникает в результате реакции на вирусную инфекцию, лекарственный препарат или другой неидентифицированный триггер окружающей среды.	Гипоклеточность костного мозга, хромосомная ломкость в тесте на разрыв хромосом не проявляется, появление клона PNG происходит у 40–50% больных.
Парциальная красноклеточная аплазия. 1: 500 000 рождений [93]	Врожденная (анемия Даймонда-Блэкфана)	Мутации генов, кодирующих как малые, так и большие рибосомальные белковые единицы => апоптоз эритроидных клеток-предшественников посредством активации и стабилизации p53 [94]; мутации транскрипционного фактора GATA.	Чистая эритроцитарная аплазия (исключая лейкоциты и тромбоциты), врожденные аномалии костей; макроцитарно-нормохромная анемия с низким уровнем ретикулоцитов, повышенные уровни среднего объема эритроцитов (MCV), аденозиндезаминазы эритроцитов (ADA) и гемоглобина F [93]. Терапия включает кортикостероиды, трансфузии эритроцитарной массы, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).
-	Приобретенная	Аутоиммунные/коллагеновые нарушения – системная красная волчанка, ревматоидный артрит; воспалительные заболевания кишечника; лимфопролиферативные заболевания; АВО-несовместимая трансплантация стволовых клеток; солидные опухоли; парвовирус В19; вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); Вирус Т-клеточного лейкоза-лимфомы, вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ); гепатит А, В, С и Е; цитомегаловирус; бактериальные инфекции - стрептококк группы С, туберкулез, бактериальный сепсис; лекарственные препараты – рекомбинантный эритропоэтин (рчЭПО); беременность; дефицит рибофлавина [92].	В мазке периферической крови выявляется нормоцитарная нормохромная анемия с ретикулоцитопенией. Количество и морфология лейкоцитов и тромбоцитов в норме. Гистологическая картина, наблюдаемая при исследовании костного мозга, зависит от причины приобретенной эритроцитарной аплазии. Специфических признаков или симптомов нет. Терапия включает устранение первичного заболевания и зависит от этого заболевания [92].

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Врожденные дизэритропоэтические анемии (CDA). 1 на 100 000 рождений в год. Описано более 150 пациентов, в основном пациентов из Западной Европы, Ближнего Востока, Индии и Японии [95]	Тип I	Приблизительно 90% случаев вызвано мутациями в CDAN1, кодирующем белок коданин-1, что, вероятно, приводит к проблеме с репликацией ДНК и к остановке S-фазы клеточного цикла эритробластов [98].	Эритроидная гиперплазия с аномальными предшественниками, демонстрирующими мегалобластоидный вид. Диспластические признаки включают заметно неравномерные ядра с частыми двуядерными эритробластами [99]. Особым диагностическим признаком CDA типа 1 являются тонкие межъядерные мостики хроматина между почти полностью разделенными эритробластами. В мазке периферической крови анизоцитоз, пойкилоцитоз, макроцитоз. Ретикулоцитопения.
Описано более 300 случаев [96].	Тип II	Мутации в гене SEC23B, кодирующем компонент белкового комплекса оболочки (COPII), функциональные изменения которого приводят к потере гомеостаза секреторного пути в эритроидных клетках-предшественниках [100]. Гипогликозилирование белков, таких как трансферрин и белок полосы 3.	Биопсия костного мозга характеризуется активной пролиферацией ядерных клеток, более 10% зрелых двуядерных эритробластов и аномальная морфология эритробластов, вторая мембрана состоящая из остаточного эндоплазматического ретикулума под цитомембраной в поздних эритробластах [100]. В мазке периферической крови анизоцитоз, пойкилоцитоз, нормоцитоз. Перегрузка железом развивается даже при отсутствии трансфузий.
Описано около 60 случаев во всем мире, большинство из которых принадлежит одной семье в Швеции [97]	Тип III	Мутация в гене KIF23, кодирующем молекулу суперсемейства кинезинов MKLP1, которая играет важную роль в цитокинезе [97].	Заболевание характеризуется внутрисосудистым гемолизом в сочетании с дизэритропоэзом в костном мозге, с крупными многоядерными эритробластами (гигантобластами, с числом ядер до 12 на клетку) [97]. В мазке периферической крови могут быть обнаружены анизопойкилоцитоз, базофильная полоса эритроцитов и несколько очень крупных эритроцитов [96]. Анемия от легкой до умеренной. Повышенный уровень тимидинкиназы.
Описано около 10 случаев	Тип IV	Мутация E325K эритроидного фактора транскрипции KLF1 с усилением функции, что вызывает остановку клеточного цикла в фазе G1 эритробластов [101]. В работе [101] выявили измененную экспрессию нескольких генов-мишеней KLF1, включая белки мембраны эритроцитов EPB41, EPB42, глутатиондисульфидредуктазу (GSR), глюкозофосфатизомеразу (GPI), АТФазу.	Заболевание сочетает в себе признаки гемоглобинопатии, дефекта мембраны эритроцитов и наследственной персистенции фетального HbF (т.е. отсутствие замены HbF в ходе взросления эритроцитов на нормальный взрослый HbA) [101]. Наблюдается снижение экспрессии белка CD44 на эритроцитах, снижение деформируемости эритроцитов, измеренное с помощью эктацитометрии.

Продолжение таблицы 6.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Замещение костного мозга. -	Злокачественные новообразования (лейкозы, лимфомы, миелома, метастазы).	Опухоль разрастается в костном мозге и замещает нормальные ростки кроветворения.	-
Заболеваемость 1:20 000 человек в год среди взрослого населения; 1: 250 000 рождений в год по всему миру.	Остеопетроз (мраморная болезнь, наследственный семейный остеосклероз, болезнь Альберс-Шенберга) [103]	Генетически гетерогенное заболевание, классифицируемое двумя типами наследования: аутосомно-рецессивным и аутосомно-доминантным. В половине случаев аутосомно-рецессивного типа обнаруживаются мутации в гене ICIR GI, кодирующем субъединицу a3 протонного насоса (H+-ATP-азы) остеокластов. В основе патофизиологического механизма всех типов заболевания лежит неспособность остеокластов реабсорбировать кость, что приводит к утолщению склерозированной кости с ослабленными механическими свойствами.	Помимо анемии, проявляется гепатоспленомегалия, атрофия зрительного нерва, тромбоцитопения и лейкоцитоз. В настоящее время единственным установленным методом лечения аутосомно-рецессивного злокачественного детского остеопетроза является трансплантация в определенных случаях гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).
Заболеваемость (1-9):100 000 человек в год [102]	Миелофиброз.	Мутации генов Янус киназы 2 (JAK2), или рецептора тромбопоэтина (Tro-P), кодируемого онкогеном MPL, или гена кальретикулина (CALR), являющегося маркером миелопролиферативных заболеваний. В некоторых случаях ни одна из этих мутаций не экспрессируется (так называемый тройной отрицательный миелофиброз). Характеризуется клональной избыточной пролиферацией стволовых клеток зрелых миелоидных ростков, таких как эритроциты, лейкоциты и мегакариоциты, ассоциированной с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом костного мозга, остеосклерозом, неэффективным эритропоэзом, ангиогенезом, экстрамедуллярным гемопоэзом и аномальной экспрессией цитокинов	Характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией и анемией с наличием ядросодержащих и каплевидных эритроцитов. Ингибиторы JAK2, такие как руксолитиниб, федратиниб или пакритниб, могут уменьшить симптомы.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Патологии созревания эритроцитов, связанные с дефицитом необходимых для этого веществ			
А. Нарушения, связанные с образованием гемоглобина			
Железодефицитная анемия. Описано 50 неродственных семей [104]	Врожденная железо-резистентная железо-дефицитная анемия	Мутации гена TMPRSS6, кодирующего матриптазу-2 (ингибитор гепсидина) [105]. Снижение функции матриптазы-2 приводит к повышению уровня гепсидина и, как следствие, снижается поступление железа из энтероцитов и выход его из макрофагов. В результате возникает микроцитарная гипохромная анемия, не купирующаяся пероральным приемом препаратов железа.	Маркером может служить высокая концентрация сывороточного гепсидина при резко сниженном содержании сывороточного железа и ферритина сыворотки. Но для окончательного подтверждения диагноза необходимо выявление мутации гена TMPRSS6 [105]. В общем анализе крови, помимо снижения гемоглобина, наблюдается резкое снижение эритроцитарных индексов (среднего объема эритроцитов (MCV) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH)).
Описано несколько случаев [105]	Нарушение транспорта/ поступления железа (гипотрансферрин)	Аутосомно-рецессивно наследуемая анемия, возникающая в результате дефицита трансферрина (лиганда трансферринового рецептора), вызванного мутациями гена, кодирующего трансферрин (TF). Низкое высвобождение железа, связанного с трансферрином, в созревающие эритробласты.	Тяжелая микроцитарная гипохромная анемия с рождения. Высокий уровень сывороточного железа, неопределяемый или низкий уровень полностью насыщенного трансферрина, высокий сывороточный ферритин и признаки перегрузки железом. Недостаток трансферрина приводит к подавлению гепсидина и системной перегрузке железом. Железо присутствует в кровотоке в виде несвязанного с трансферрином железа (NTBI), высокотоксичной формы железа, которая легко поглощается паренхиматозными клетками, включая гепатоциты, панкреатические островки и кардиомиоциты.
Известны менее 10 семей с мутацией гена, кодирующего DMT1, и только одна с мутацией гена, кодирующего STEAP3 [106].	Нарушение цикла трансферринового рецептора (TF-TFR1)	Мутации генов, кодирующих белки, участвующие в цикле трансферинового рецептора (TFR), такие как протон-сопряженный переносчик ионов двухвалентного металла 1 (DMT1) или 6-ой трансмембранный эпителиальный антиген простаты 3 (STEAP3). Мутации этих белков нарушают цикл трансферринового рецептора.	Микроцитарная анемия различной степени тяжести (менее тяжелая, чем при гипотрансферринемии), высокое насыщение трансферрина железом и высокий ферритин сыворотки, снижение гепсидина, перегрузка железом [105].

Продолжение таблицы 6.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Наиболее распространенная анемия из-за нарушения питания во всем мире. В России, по данным разных авторов, железодефицитная анемия регистрируется у 6-40% детского населения [293].	Приобретенная	Снижение потребления или всасывания железа в результате недоедания, сопутствующих заболеваний (хроническое заболевание почек, сердечная недостаточность, ожирение, воспаление, атрофический гастрит, глютеновая болезнь и др.), хронической кровопотери или операционных вмешательств [107].	При диагностике оценивают уровни гемоглобина в крови, ферритина в сыворотке и процент насыщения трансферина железом [107]. Эритроциты микроцитарные и гипохромные (снижение MCV и MCH), увеличивается ширина распределения эритроцитов по размеру (RDW). Изменения в индексах эритроцитов происходят не быстро, а по ходу жизни эритроцитов, поэтому их диагностическая значимость ограничена.
Сидеробластные анемии (нарушение утилизации железа) Редкие заболевания, распространенность не установлена [108]	Врожденные	Причинами сидеробластной анемии могут являться ухудшенный синтез гема, ухудшенная сборка и транспорт Fe-S кластеров, или ухудшенный синтез митохондриальных и цитозольных белков, необходимых для синтеза гема. Например: **А.** X-сцепленная мутация гена ALAS2, кодирующего δ-аминолевулинатсинтазу-2, первый фермент в пути синтеза гема [108]. Это фермент играет важную роль в функционировании кластера Fe-S, участвующего в биосинтезе гема. **Б.** X-сцепленная мутация белка ABCB7, подсемейства АТФ-связывающей кассеты B (член 7), который считается ответственным за экспорт кластера Fe-S из митохондрий в цитоплазму. Потеря функции этого белка может ухудшать синтез гема и, следовательно, эритропоэз. **В.** X-сцепленная мутация в гене NDUFB11, кодирующем белок NADH:убихинон оксидоредуктазная субъединица B1, существенный для окислительного фосфорилирования. Частичное нарушение функции этого белка может приводить к тяжелым мультиорганным нарушениям, таким как миопатия, ацидоз, опосредованный молочной кислотой, или сидеробластная анемия. **Г.** Аутосомально-рецессивная форма заболевания, связанная с мутациями генов SLC19A2 и SLC25A38. Первый тип мутаций (их достаточно много) приводит к снижению в клеточной мембране количества транспортера тиамина 1 (тиамин-носитель 1, TC1), что снижает вток тиамина в клетку.	Морфологическим признаком этой анемии является то, что при специальном окрашивании по Перлу в мазках костного мозга обнаруживается более 15% кольцевидных сидеробластов (ядросодержащих эритробластов с патологическим накоплением гранул железа в митохондриальном матриксе) [108]. Пациенты с мутацией в белке, кодируемом ALAS2, могут реагировать на фармакологические дозы пиридоксина (витамин B6). Некоторые мутации в C-концевой области этого белка вызывают доминантную эритропоэтическую протопорфирию вместо сидеробластной анемии [109]. Анемия, связанная с мутацией SLC25A38, как правило, тяжелее, чем ALAS2-связанная, и является трансфузионнозависимой, начиная с младенчества.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
		Это связано с мегалобластозом в эритроидной, миелоидной и мегакириоцитной линиях клеток. Мутации в гене SLC25A38, кодирующем митохондриальный белок, участвующий в транспорте глицина, также оказывают влияние на синтез гема в эукариоцитах. **Д.** Мутации в генах GLXR5, HSPA9 и HSCB, которые кодируют белки, необходимые для образования Fe-S кластеров, снижают синтез гема. Все перечисленные мутации нарушают синтез гема и характеризуются накоплением железа в митохондриях эритробластов.	
-	Приобретенные	Возникают на фоне диспластического кроветворения мутировавших стволовых и прогениторных клеток при миелодиспластическом синдроме, а также на фоне отравления тяжелыми металлами (свинец, мышьяк), передозировки цинка и дефицита меди, дефицита витамина B6, злоупотребления алкоголем, лечения такими препаратами, как изониазид, хлорамфеникол или линезолид, которые препятствуют биосинтезу гема [108].	Проявляются накоплением кольцевых сидеробластов в костном мозге.
Нарушение реутилизации железа (ацерулоплазминемия) В Японии частота встречаемости составляет 1: 2 000 000 человек. Данных о распространенности этого расстройства за пределами Японии нет [110].	Врожденные	Мутации гена, кодирующего церулоплазмин (CP) [105]. Ферроксидазная активность CP необходима для экспорта железа из макрофагов, гепатоцитов и нервных клеток и высвобождения его в трансферрин в форме трехвалентного железа.	Синдром, определяется как расстройство, называемое «нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге» [105]. Проявляется в виде дегенерации сетчатки, сахарного диабета и неврологических заболеваний (атаксия, двигательное расстройство и когнитивная дисфункция)[111]. Нормохромная нормоцитарная или слегка микроцитарная анемия легкой или умеренной степени (и диабет) появляются раньше неврологической симптоматики [105]. Наблюдаются анемия, низкая насыщенность трансферрина и низкий уровень меди в сыворотке при сосуществующем с ним высоким уровнем ферритина в сыворотке. CP в сыворотке не определяется.

Продолжение таблицы 6.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Б. Аномалии созревания ядра (нарушение синтеза ДНК и РНК)			
Дефицит витамина B12 Распространенность макроцитарной анемии в Нидерландах составляет 7,5%, из них 18% связано с дефицитом B12[112].	Приобретенный	Причины, способные вызывать дефицит витамина B12: **А.** Пернициозная анемия, вызванная аутоиммунной атрофией желудка, приводящая к снижению продукции внутреннего фактора, связывающего B12 в двенадцатиперстной и тонкой кишке. **Б.** Гастрэктомия, резекция подвздошной кишки или илеит любой этиологии (воспаление нижней части тонкой кишки). **В.** Другие причины, вызывающие нарушения всасывания витамина B12, включают синдром Золлингера-Эллисона, синдром слепой петли, инвазию рыбьим цепнем и недостаточность поджелудочной железы **Г.** Недостаточность поступления витамина с пищей. Недостаток витамина B12 приводит к нарушению синтеза ДНК [112]. Цитоплазма (в которой синтез гемоглобина не изменен) созревает с нормальной скоростью, а ядро созревает не полностью. Клетки останавливаются в фазе синтеза ДНК (S) с ошибками репликации ДНК, что в конечном итоге приводит к апоптотической гибели клеток.	На миелограмме видны мегалобластоз и гиперсегментированные нейтрофилы, которые обнаруживаются в мазке периферической крови [112]. В мазке крови наблюдается также макроцитарная анемия (MCV >100 фл), пойкилоцитоз и анизоцитоз из-за неэффективного эритропоэза. Оценка костного мозга показывает гиперклеточность с аномальным созреванием и пролиферацией предшественников эритроцитов.
Встречается во всем мире, но его распространенность выше в нескольких странах Ближнего Востока и Норвегии, а самая высокая в Финляндии (0,8:100 000 человек) [113]	Врожденный (связан с нарушениями всасывания B12).	Возможные причины: **А.** Качественно аномальный внутренний фактор, связывающий кобаламин (IF) [114]. **Б.** Сниженный синтез транскобаламина [115]. **В.** Дефект кишечного эпителия, приводящий к снижению связывания кобаламина с IF и к неспособности абсорбировать кобаламин (мутации в гене CUBN, кодирующем рецептор связывания внутреннего фактора с витамином B12 (кубилин)) [113]. Синдром Имерслунда-Грасбека.	Мегалобластная анемия с неврологическими симптомами и иногда протеинурией, которые могут быть единственными проявлениями.

Название и распространенность	Тип	Причина	Особенности
Дефицит фолатов Составляет 0,16% (в отчете за 2015 год, Канада). Данных по России нет.	Приобретенный	Недостаток фолиевой кислоты приводит к нарушению синтеза ДНК, аналогично дефициту витамина B12. Причины дефицита[116]: **А.** Алиментарная недостаточность (недостаток употребления сырых овощей). **Б.** Нарушение всасывания в кишечнике (резекция тонкой кишки, целиакия, хронические энтериты, амилоидоз, склеродермия, лимфатические и другие опухоли тонкой кишки, хронический алкоголизм). **В.** Использование медикаментов – антагонистов фолиевой кислоты. **Г.** Повышенная потребность в фолатах. **Д.** Повышенное потребление фолатов в кишечнике (глистная инвазия, синдром слепой кишки). **Е.** Повышенное выведение (гемодиализ).	Мегалобластная анемия, аналогичные проявления, характерные для приобретенных дефицитов витамина B12 [112]. Уровень метилмалоновой кислоты повышен при дефиците витамина B12, но не при дефиците фолиевой кислоты.
-	Врожденный	Возможные причины: **А.** Мальабсорбция фолиевой кислоты в результате дефектов генов протонно-связанного транспортера фолиевой кислоты (PCFT), локализованного в тонкой кишке и в сосудистом сплетении [117]. **Б.** Дефицит L-глутамат N-формиминотрансферазы, участвующей в метаболическом пути деградации L-гистидина с участием фолатов [118].	В обоих случаях наблюдается мегалобластная анемия, задержка развития, неврологический дефицит. При мальабсорбции наблюдается снижение содержания фолиевой кислоты в сыворотке и спинномозговой жидкости, в присутствии нормального уровня фолиевой кислоты, витамина B12 и гомоцистеина вне нервной системы, низкий уровень метионина в плазме и повышенная экскреция N-формимино-L-глутаминовой кислоты с мочой [117].
Оротовая ацидурия -		Дефицит уридинмонофосфатсинтазы, фермента, участвующего в синтезе пиримидина. При наличии дефицита происходит накопление оротовой кислоты, с клиническими проявлениями мегалобластной анемии, оротовой кристаллурии (образования камней с участием оротовой кислоты), нефропатии.	Мегалобластная анемия проявляется не всегда [119]. Гематологическая ремиссия может быть достигнута заместительной уридиновой терапией.

2.2.2. Постгеморрагическая анемия

Постгеморрагическая анемия – состояние, при котором анемия не связана с качеством эритроцитов или их синтезом. Такая анемия возникает в результате внезапной массивной кровопотери, например при тяжелой травме (острая постгеморрагическая анемия, ОПГА) или повторных и длительных кровопотерях в результате кровотечения в желудочно-кишечном тракте, разрыва селезенки, разрыва при внематочной беременности, субарахноидального кровоизлияния и др. (хроническая постгеморрагическая анемия) [120]. В первом случае анемия вызвана прямой потерей эритроцитов, во втором случае в конечном счете развивается дефицит железа, что приводит к железодефицитной анемии, которая будет рассмотрена далее. Диагноз острой постгеморрагической анемии обычно не вызывает затруднений, хотя иногда эпизоды внутреннего кровотечения (например, после травматического повреждения), даже большие, могут быть неочевидными. Резкое падение гемоглобина указывает на ОПГА. В случае ОПГА лечение проводится восполнением потерянной крови. При оказании экстренной помощи останавливают кровотечение и устраняют его источник. В случае хронической постгеморрагической анемии поиск и устранение причины анемии является первоочередной задачей.

2.2.3. Гемолитическая анемия

В случае гемолитической анемии происходит ускоренное разрушение и, следовательно, сокращение продолжительности жизни эритроцитов в кровотоке (<120 дней). Гемолиз происходит и в нормальной крови, однако степень его ниже (примерно 1% в день). В зависимости от причины заболевания гемолиз может быть внутрисосудистый (происходить непосредственно в кровотоке) и внесосудистый (в селезенке). Оба типа гемолиза приводят к истощению количества циркулирующих эритроцитов, то есть к анемии. Анемия возникает, когда продукция костного мозга не может компенсировать сокращение количества эритроцитов.

К классическим клиническим проявлениям гемолитической анемии относятся снижение уровня гемоглобина в крови, ретикулоцитоз, спленомегалия, желтуха. В лабораторных анализах наблюдается повышенный уровень неконъюгированного билирубина в сыворотке, снижение уровней гаптоглобина, лактата, пирувата.

Более распространенным является внесосудистый гемолиз. В норме старые эритроциты в конце жизни удаляются из кровообращения макрофагами селезенки и, в меньшей степени, печени и костного мозга. Циркулирующая кровь непрерывно фильтруется через тонкостенные селезеночные тяжи в синусоиды селезенки, представляющие собой губчатый лабиринт, внутри которого находятся макрофаги с длинными дендритными отростками [121]. Нормальный эритроцит (диаметром 7-8 мкм) может деформироваться и проходить через отверстия размером 3 μм в селезеночных тяжах. Эритроциты со структурными изменениями поверхности мембраны (включая клетки, связанные с антителами) не могут пройти через эту сеть и подвергаются фагоцитозу и разрушению макрофагами. Разрушение гемоглобина эритроцитов,

захваченных этими клетками, происходит, главным образом, с помощью гемоксигеназы, расщепляющей гем до трех продуктов – ионов двухвалентного железа, монооксида углерода и биливердина [122]. Железо сохраняется и реутилизируется, а биливердин превращается в билирубин, который в печени конъюгируется с глюкуроновой кислотой и выводится с желчью.

В нормальном физиологическом состоянии внутрисосудистому гемолизу подвергается небольшой процент эритроцитов. Этот гемолиз приводит к высвобождению гемоглобина из эритроцитов в плазму, где он димеризуется и быстро связывается с сывороточным белком гаптоглобином [123]. Комплекс гаптоглобин-гемоглобин распознается рецептором CD163 на поверхности моноцитов/макрофагов, что вызывает гаптоглобин-гемоглобиновый эндоцитоз и деградацию гемоглобина. Кроме того, гем свободного гемоглобина, содержащий Fe2+, может окисляться с образованием железа Fe3+. Этот гем затем высвобождается из гемоглобина и связывается с гликопротеином плазмы – гемопексином. Гем, связанный с гемопексином, расщепляется в печени в ходе ряда ферментативных реакций. Чрезмерный внутрисосудистый гемолиз истощает эти системы удаления гемоглобина и приводит к накоплению гемоглобина и гема в плазме (гемоглобинемии). Клубочковая почечная фильтрация становится основным путем удаления свободного гемоглобина и гема из кровотока [124], развивается гематурия. Свободный гемоглобин выводится из кровотока почками с периодом полувыведения менее 1 часа [125], при этом почки подвергается воздействию больших количеств свободного гемоглобина, что приводит к острому повреждению клеток почечных канальцев. Кроме того, плазменный гемоглобин и гем опосредуют прямые провоспалительные, пролиферативные и прооксидантные эффекты на эндотелиальные клетки сосудов. Это происходит за счет истощения гемоглобином эндотелиального NO, катализируемых гемоглобином окислительных реакций, связывания гема с толл-подобным рецептором 4 (TLR4) на эндотелиальных клетках и лейкоцитах [126–128]. В совокупности токсические эффекты свободного гемоглобина сводятся к эндотелиальной дисфункции, включая вазоконстрикцию и снижение кровотока, усиление воспаления, активацию тромбоцитов, повреждение органов, тромбозы, дерегуляцию (снижение регуляции) иммунной системы [129]. Нарушение регуляции тонуса гладкой мускулатуры приводит к дистониям (стойким непроизвольным мышечным сокращениям), включая системную и легочную гипертензию.

Выживаемость эритроцитов снижается либо из-за внутренней аномалии клетки, либо из-за внешних факторов, либо из-за того и другого вместе. Внутренние аномалии структуры или функции гемоглобина, мембраны эритроцитов или метаболизма эритроцитов, как правило, передаются по наследству. Внешние причины включают антитела, направленные к эритроцитам, нарушения сосудистой системы или присутствие инфекционных организмов и токсических веществ.

2.2.3.1. Врожденные гемолитические анемии

Наследуемые мутации могут быть причиной нарушений в структуре гемоглобина (гемоглобинопатии), мембраны (мембранопатии) и метаболизма эритроцитов (ферментопатии).

Ферментопатии

Для поддержания формы и объема, защиты от активных радикалов кислорода, восстановления метгемоглобина в гемоглобин и эффективной отдачи кислорода тканям эритроцитам нужна энергия в виде ATP и вспомогательные вещества, необходимые в реакциях окисления-восстановления (никотинамидадениндинуклеотиды (NAD/NADH) и никотинамидадениндинуклеотидфосфаты (NADP/NADPH), восстановленный и окисленный глутатион).

В зрелых эритроцитах человека нет ядра и митохондрий. Отсутствие этих структур освобождает больше места в цитоплазме клетки для гемоглобина, основного переносчика кислорода, и позволяет клетке иметь хорошую деформируемость [130]. Набор ферментов, присутствующих в каждом эритроците, формируется в их ядерных предшественниках. В эритроцитах не синтезируются нуклеиновые кислоты или белки и не перерабатываются жиры для получения энергии, поэтому эритроциты не могут синтезировать новые ферменты в течение жизни. Глюкоза, поступающая из плазмы, является основным источником энергии для эритроцитов. Они используют путь Эмбдена-Мейергофа (гликолиз) для анаэробной переработки глюкозы в аденозинтрифосфат (ATP) (рисунок 3). В дополнение к продукции ATP путь Эмбдена-Мейергофа отвечает за восстановление NAD до NADH.

С помощью инсулиннезависимого переносчика GLUT1 глюкоза попадает в эритроцит, где фосфорилируется гексокиназой (HK) в глюкозо-6-фосфат (G6P). Весь дальнейший путь гликолиза и в целом метаболизм эритроцита представлен на рисунке 4. Глюкозо-6-фосфат, помимо основного гликолитического пути, расходуется в гексозомонофосфатном (или пентозофосфатном) шунте, который важен для защиты эритроцита и гемоглобина от окислительного стресса. Основным метаболитом, обеспечивающим антиоксидантную защиту эритроцита, является восстановленный глутатион. Гексозомонофосфатный шунт поддерживает в клетке необходимый уровень этого глутатиона, т. к. позволяет восстанавливать NADP до NADPH, необходимого для восстановления окисленного глутатиона. Ферменты эритроцитов и гемоглобин защищены от окислительного повреждения за счет действия восстановленного глутатиона, который поддерживает гемоглобин в восстановленной активной форме и участвует в восстановлении активных форм кислорода.

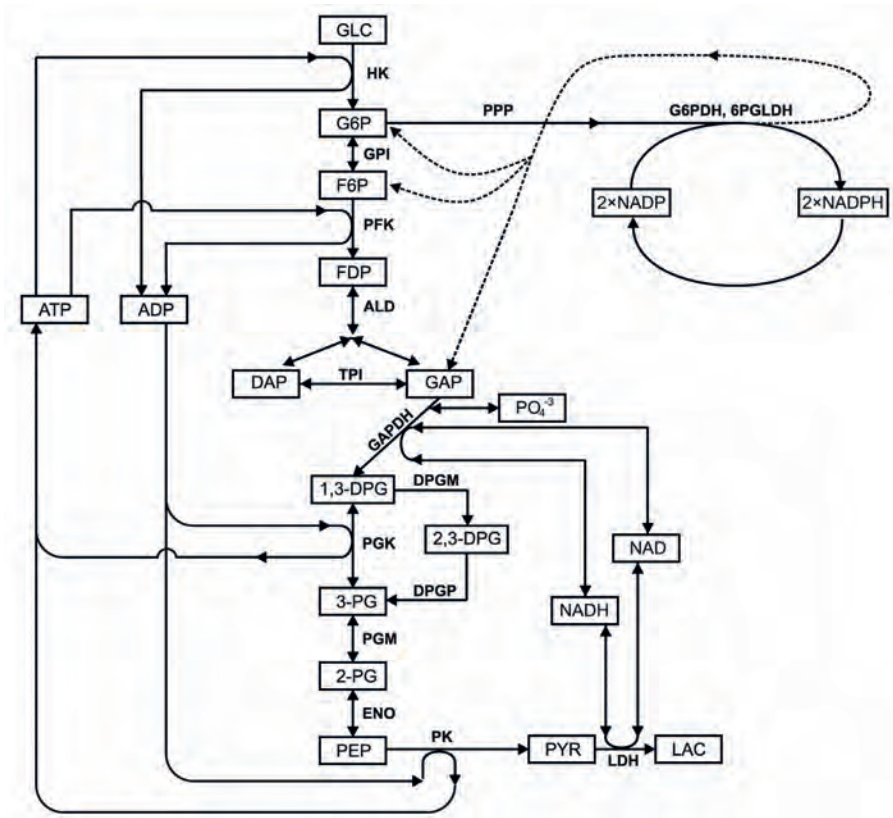

Рисунок 3. Гликолиз и первые 3 реакции окислительного этапа пентозофосфатного пути (PPP) (реакция превращения G6P в 6-фосфоглюконо-δ-лактон (фермент G6PDH), реакция превращения 6-фосфоглюконо-δ-лактона в 6-фосфоглюконат (фермент 6-фофсоглюконолактоназа) и реакция превращения 6-фосфоглюконата в рибулозо-5 фосфат (фермент 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGLDH)). В первой и третьей реакциях PPP 2 молекулы NAD превращаются в 2 молекулы NADH. Подробные детали PPP см. на рис. 3. Использованные сокращения: GLU – глюкоза, G6P – глюкозо-6-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, FDP – фруктозодифосфат, DAP – диоксиацетонфосфат, GAP – глицеральдегидфосфат, 1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат, 2,3-DPG – 2,3-дифосфоглицерат, 3-PG – 3-фосфоглицерат, 2-PG – 2-фосфоглицерат, PEP – фосфоенолпируват, PYR – пируват, LAC – лактат, ATP – аденозинтрифосфат, ADP – аденозиндифосфат, NAD и NADH никотинамидадениндинуклеотид окисленный и восстановленный, соответственно, NADP и NADPH никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный и восстановленный, соответственно, PO_4^{-3} – ион неорганического фосфата, HK – гексокиназа, GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза, PFK – фосфофруктокиназа, ALD – альдолаза, TPI – триозофосфатизомераза, GAPDH – глицеральдегидфосфадегидрогеназа, PGK – фосфоглицераткиназа, DPGM – дифосфоглицератмутаза, DPGP – дифосфоглицератрофатаза, PGM – фосфоглицератмутаза, ENO – энолаза, PK – пируваткиназа, LDH – лактатдегидрогеназа, PPP – пентозофосфатный путь, G6PDH – глюкозо-6-фосфаидегидрогеназа, 6PGLDH – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа.

Важное значение в основном гликолитическом пути играет шунт 2,3-дисфосфоглицерата, или шунт Рапопорта-Люберинга. Наиболее важной функцией 2,3-DPG является снижение сродства Hb к O_2. Регуляция связывания Hb

с кислородом устроена таким образом, чтобы он мог максимально связывать и отдавать O_2 именно там, где это необходимо. S-образная форма кривой диссоциации оксигемоглобина, которая обеспечивается существованием кооперативности связывания субъединиц гемоглобина с кислородом, а также регуляция этого связывания с помощью 2,3-DPG, который сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина вправо, позволяют гемоглобину эффективно связывать кислород в легких и отдавать его в тканях, где давление O_2 гораздо ниже (100 мм рт. ст. против 20-30 мм рт. ст., соответственно) (рисунок 4) [59]. Когда в периферических тканях увеличивается количество дезоксигемоглобина, стимулируется гликолиз и повышается уровень 2,3-DPG [131]. Концентрация 2,3-DPG в эритроцитах особенно чувствительна к pH, так как ферменты, катализирующие его продукцию, ингибируются или стимулируются ионами водорода. Также в эритроцитах поддерживается постоянный пул адениновых нуклеотидов (ATP, ADP и AMP). Поскольку зрелый эритроцит не синтезирует их *de novo*, пул аденилатов сохраняется за счет их взаимопревращений.

Ферментопатии в эритроцитах могу затрагивать основной гликолитический путь, антиоксидантную систему и метаболизм адениновых нуклеотидов. Помимо вышеперечисленных признаков гемолиза, для разных ферментопатий характерно изменение концентраций разных метаболитов в эритроцитах. Выраженных морфологических аномалий эритроцитов не наблюдается, кроме случая дефицита пиримидин 5'-нуклеотидазы (см. ниже). Осмотическая резистентность эритроцитов, как правило, в норме. Термин «наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия» используется для описания гемолитической анемии, при которой на окрашенных участках в мазке периферической крови не удается обнаружить аномалий эритроцитов и, в частности, сфероцитоза [131].

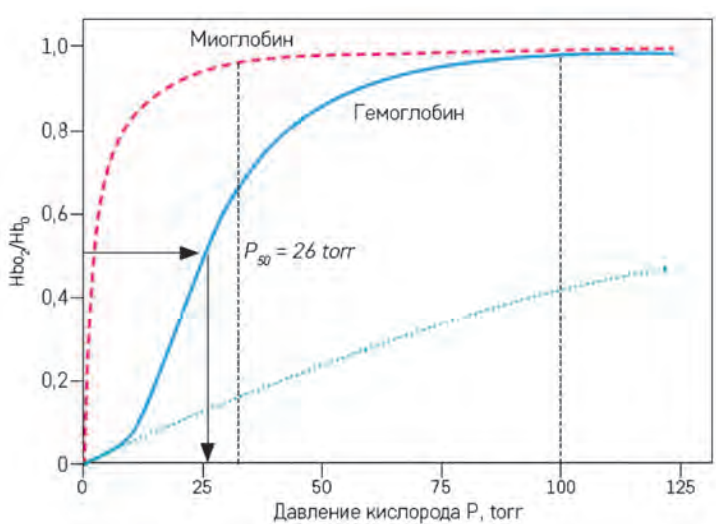

Рисунок 4. Кривые связывания с кислородом гемоглобина (сплошная кривая), миоглобина, который не обладает кооперативностью при связывании с кислородом (красная пунктирная кривая), а также гипотетическая кривая связывания гемоглобина с кислородом

при отсутствии кооперативности связывания его субъединиц с кислородом (мелкий пунктир). Левая и правая вертикальные пунктирные линии определяют давление кислорода в тканях и легких, соответственно. Hb_{O2} и Hb_0 – концентрация гемоглобина, связанного с кислородом и полная концентрация гемоглобина, соответственно. P_{50} –давление кислорода, при котором половина гемоглобина связана с кислородом (1 мм рт. ст. равен 1 torr). 2,3-DPG уменьшает сродство Hb к кислороду, т. е. смещает синюю кривую вправо [59].

Ферментопатии в пути Эмбдена-Мейергофа

Пируваткиназа. Дефицит пируваткиназы (PK) является наиболее часто встречающимся дефицитом в пути Эмбдена-Мейергофа, вызывающим наследственную несфероцитарную гемолитическую анемию [132]. Пируваткиназа – аллостерический фермент, катализирующий образование пирувата из фосфоенолпирувата (PEP) с одновременным образованием ATP из аденозиндифосфата (ADP). Эритроциты с дефицитом пируваткиназы не могут продуцировать достаточно ATP для поддержания своего функционирования, что приводит к их преждевременному гемолизу. Снижение активности PK приводит к накоплению 2,3-DPG и PEP (рисунок 3). Повышение уровня 2,3-DPG позволяет эритроцитам легче отдавать кислород тканям, что выступает в качестве компенсаторного механизма развивающейся гемолитической анемии.

Существует два отдельных гена (*PKLR* и *PKM*), которые кодируют четыре изоформы пируваткиназы: PKR, PKL, PKM_1 и PKM_2. Ферменты PKM_1 и PKM_2 кодируются геном *PKM*, тогда как ген *PKLR* кодирует изоформу PK в эритроцитах (форма PKR), а также изоформу фермента PKL, которая экспрессируется преимущественно в печени и реже в почках и кишечнике. PKM_1 преобладает в скелетных мышцах, сердце и мозге, а PKM_2 в основном экспрессируется в ранних эмбриональных и пролиферирующих тканях [133].

Распространенность диагностированного дефицита PK в эритроцитах среди западного населения находится в диапазоне 3,2-8,5 на 1 000 000 населения [134]. Причиной данного заболевания является наличие мутации в гене *PKLR* [132]. В настоящее время обнаружено более 300 мутаций в этом гене, наследующихся по аутосомно-рецессивному типу.

Клинические проявления дефицита PK включают классические симптомы гемолитической анемии (см. выше), а также повышение концентрации 2,3-DPG и PEP в эритроцитах. Диагноз определяется измерением активности фермента в эритроцитах и анализом ДНК для выявления мутаций. Остаточная ферментативная активность в эритроцитах *in vitro* у гомозигот обычно составляет <25% от нормы, тогда как активность у гетерозигот снижается до 40%-60% [132]. У некоторых пациентов может наблюдаться нормальная или даже повышенная активность PK. Это может быть связано с контаминацией образцов пациентов нормальными донорскими эритроцитами после проведенной трансфузии, неполным удалением лейкоцитов из образцов для измерения активности или наличием в зрелых эритроцитах изоформы фермента PKM_2, кодируемого геном *PKM*. PKM_2 является основным изоферментом предшественников эритроцитов (в которых активность PK высокая). Во время нормальной эритроидной дифференцировки происходит переключение экспрессии формы изофермента PKM_2 на PKR. Однако сообщалось

о возможности сохранения экспрессии изофермента PKM_2 в эритроцитах пациентов (и животных) с тяжелым дефицитом РК [135]. Это увеличивает суммарную активность РК, что может быть компенсаторным механизмом для выживания этих пациентов [136].

Степень тяжести анемии при гемолитических анемиях варьирует в широких пределах: от очень легкой или полностью компенсированной формы до угрожающей жизни неонатальной анемии, требующей трансфузий. Клинические симптомы обычно возникают у сложных гетерозигот (с двумя различными мутантными аллелями) и у гомозигот [132]. Хотя в некоторых случаях наблюдается четкая и прямая корреляция между генотипом и фенотипом пациента. Известно, что пациенты с идентичными генотипами могут иметь разную степень тяжести заболевания. Особенно часто это проявляется в случае мутации c.1529G>A. Анализ большого числа гомозиготных больных с этой мутацией выявил большую вариабельность тяжести заболевания (Hb 4,9–12,2 г/дл; доля ретикулоцитов 4–66%) даже в пределах одной семьи [137]. Клинические симптомы варьируют от легкого компенсированного гемолиза до промежуточных и тяжелых анемий, для некоторых из этих пациентов показано сохранение активности изофермента M_2-типа в их эритроцитах, на долю которого приходится около половины остаточной РК-активности [138]. Мутация c.1529G>A приводит к замене аминокислоты аргинина 510 на глутамин, что дестабилизирует ферментный белок. Основным фактором, определяющим активность РК, является основная мутация, приводящая к ферменту со сниженной активностью и с измененной стабильностью, что влияет на второй вариабельный фактор – внутриклеточную протеолитическую активность. Было показано in vitro сниженная термостабильность при 53°C и повышенная чувствительность к протеолитическому расщеплению мутантного фермента по сравнению с нормальным ферментом. Вариабельность клинических проявлений также может зависеть от возможных индивидуальных различий в гемопоэзе, функции селезенки, метаболической или протеолитической активностей, которые могут по-разному модулировать основной эффект мутации, от различных уровней 2,3 DPG, от способности компенсировать дефицит фермента за счет сверхэкспрессии других изоферментов или использования альтернативных компенсаторных путей [132]. Клинический фенотип может быть изменен, если параллельно были унаследованы другие дефекты эритроцитов. Так был показан комбинированный дефицит РК и белка полосы 3 [139,140], РК и α-талассемии [141], РК и G6PD [142]. Кроме того, вариабельности клинической картины могут способствовать осложнения, наблюдаемые при дефиците РК.

Спленэктомия частично уменьшает гемолитическую анемию и снижает трансфузионную нагрузку у 90% пациентов, а также повышает уровень гемоглобина в среднем на 1,6 г/дл [143]. Переливание крови у детей с дефицитом РК является распространенным явлением: 87% пациентов моложе 18 лет получают хотя бы 1 переливание в течение жизни. Вирусные инфекции зачастую провоцируют гемолиз и трансфузионную зависимость. Около 50% детей в возрасте до 5 лет регулярно получают трансфузии со средним интервалом в 5 недель. Большинству таких пациентов проводится спленэктомия в возрасте около 5 лет, после чего переливание крови осуществляется только

при острых стрессовых ситуациях. Доля пациентов, получающих регулярные трансфузии, снижается с возрастом (11% у взрослых против 36% у детей), что связано с меньшей частотой гемолитических эпизодов, связанных с инфекциями, а также со сроками проведения спленэктомии. Регулярные трансфузии провоцируют перегрузку железом у взрослых и детей, для выведения которого применяется хелатирующая терапия.

В 2022 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило аллостерический низкомолекулярный активатор пируваткиназы митапиват (mitapivat) в качестве первого препарата для лечения гемолитической анемии у взрослых с дефицитом пируваткиназы. Исследования безопасности и эффективности данного препарата у детей пока не проводились [144]. Повышение гемоглобина в крови наблюдалось у 50% участников исследования. Среднее повышение гемоглобина составляло 3,4 г/дл (диапазон 1,1-5,8). Наблюдалась взаимосвязь между генотипом и повышением гемоглобина: пациенты, имеющие миссенс-мутации (однонуклеотидные точечные мутации), лучше отвечали на терапию. У пациентов с более серьезными мутациями (гомозиготный вариант R479H) повышения гемоглобина в крови не наблюдалось. Кроме того, наблюдалась взаимосвязь между уровнем белка PK эритроцитов и повышением гемоглобина, что, вероятно, указывает на то, что для активации митапиватом требуется минимальное количество полноразмерного белка PK [145].

Глюкозо-6-фосфатизомераза. Дефицит глюкозо-6-фосфатизомеразы (GPI) считается второй наиболее распространенной ферментопатией в гликолитическом пути эритроцита после дефицита пируваткиназы [132]. На сегодняшний день зарегистрировано около 90 пациентов с дефицитом GPI по всему миру с момента первого сообщения в 1968 году [146]. Средний возраст постановки диагноза сильно различается (от рождения до 50 лет). Глюкозо-6-фосфатизомераза представляет собой димерный фермент второй стадии гликолиза, который катализирует обратимую изомеризацию глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Дефицит GPI наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Большинство пациентов являются компаунд-гетерозиготными (генотип, гетерозиготный по двум мутантным аллелям одного локуса) по мутациям, которые частично инактивируют фермент. Простые гетерозиготы с дефицитом GPI бессимптомны, активность GPI в этих случаях составляет 40-60% от нормы. Тяжесть анемии у пациентов с дефицитом GPI варьирует от легкой до тяжелой (у гомозигот или сложных гетерозигот, у которых активность GPI может составлять 10-25% от нормы). Практически все зарегистрированные мутантные ферменты характеризуются выраженной температурной нестабильностью [147], кроме случаев, описанных в работах [148,149], измененной каталитической активностью и скоростью электрофоретической миграции [147], а эритроциты с данным дефицитом характеризуются сниженной деформируемостью [150,151]. Большинство мутаций нарушают архитектуру активного центра фермента [152,153]. Следствием снижения активности GPI является повышение уровня G6P, что вызывает ингибирование гексокиназы по принципу обратной связи и может приводить к снижению скорости гликолиза [154]. Увеличение внутриклеточной

концентрации G6P приводит к ускоренному шунтированию через пентозофосфатный путь. При тяжелом дефиците GPI шунт может работать с максимальной или почти максимальной пропускной способностью. При тяжелых дефицитах GPI отмечается снижение концентрации метаболитов фруктозо-6-фосфата (F6P) и фруктозо-1,6-дифосфата (FDP). Ген, кодирующий GPI, также кодирует нейролейкин и нейротрофический фактор, который поддерживает выживание эмбриональных спинальных нейронов, скелетных нейронов и сенсорных нейронов, поэтому в редких случаях также сообщалось об умственной отсталости или нервно-мышечных симптомах у больных с дефицитом GPI [148]. Диагноз дефицита GPI основывается на определении его ферментативной активности в эритроцитах и анализе наличия мутаций в гене, кодирующем GPI. Спленэктомия при данном дефиците значительно снижает или устраняет потребность в переливании крови.

Фосфофруктокиназа. Дефицит фосфофруктокиназы (PFK) – очень редкое аутосомно-рецессивное заболевание с гетерогенными клиническими симптомами, в основном характеризующееся миопатией и/или гемолизом. В эритроцитах PFK катализирует с помощью ATP фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-дифосфата [132]. Во внутриклеточных условиях эта реакция почти необратима. Следовательно, PFK является важным регулятором гликолитического потока. Фермент активен в присутствии магния. Также к наиболее важным активаторам PFK относятся ADP, циклический аденозинмонофосфат (cAMP) и фруктозо-2,6-дифосфат. Ингибируется PFK его субстратом (ATP), цитратом и лактатом. По-видимому, ассоциация фермента с белком полосы 3 [155] и актином [156] ингибирует и стимулирует активность PFK, соответственно.

Эритроциты содержат пять изоферментов PFK, состоящих из субъединиц M и L (M4, M3L, M2L2, ML3 и L4) [157]. Субъединицы кодируются разными генами – *PFKM* и *PFKL*, соответственно. Мутации, приводящие к отсутствию субъединицы M, коррелируют с наличием гемолиза. Мышцы содержат исключительно субъединицы M. Частичный дефицит PFK приводит к несфероцитарной гемолитической анемии, которая может сопровождаться миопатией (болезнь Таруи, или гликогеноз VII типа) [158]. При данном заболевании мутация нарушает способность FPK фосфорилировать фруктозо-6-фосфат, что в итоге предотвращает образование ATP из ADP. Болезнь Таруи является результатом гомозиготности по каталитически неактивной M-субъединице (субъединицам), тогда как у гетерозигот, имеющих мутантные субъединицы M или L, возникает клинически бессимптомное состояние.

Во всем мире было зарегистрировано около 100 пациентов с дефицитом PFK [159]. Анемии, возникающие в этом случае, как правило, сопровождаются легким гемолизом, который не обязательно сопровождается существенным снижением гемоглобина в крови [157]. Наблюдается снижение активности фермента до 50-60% от нормы. У пациентов с дефицитом PFK наблюдается повышение уровней гексозомонофосфатов и снижение концентрации 2,3-DPG в эритроцитах, чем можно объяснить отсутствие анемии у некоторых пациентов, несмотря на гемолиз.

Триозофосфатизомераза. Дефицит триозофосфатизомеразы (TPI) является еще более редким аутосомно-рецессивным заболеванием. С момента

первоначального описания в 1965 г. в литературе было описано менее 50 пациентов с клиническими проявлениями дефицита TPI [160]. TPI является важным гликолитическим ферментом и катализирует взаимное превращение дигидроксиацетонфосфата (DAP) и глицеральдегид-3-фосфата (GAP). TPI регулирует быстрое равновесие триозофосфатов, а GAP метаболизируется находящимся ниже по каскаду гликолиза ферментом, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. Снижение активности TPI приводит к значительному повышению концентрации DAP в эритроцитах.

TPI человека кодируется одним геном, расположенным на хромосоме 12p13 и экспрессируется во всех тканях [161]. Она представляет собой стабильный гомодимер двух субъединиц массой 27 кДа. Фермент каталитически активен только в димерной форме. Предполагается, что в основе патогенеза дефицита TPI может лежать измененное образование димера и нестабильность фермента [162].

Клиническими признаками заболевания являются гемолитическая анемия, прогрессирующая нервно-мышечная дисфункция и повышенная восприимчивость к инфекциям, что приводит к тяжелому заболеванию и смерти в раннем возрасте. Дефицит TPI клинически обычно является наиболее тяжелым из ферментативных дефектов гликолитического пути.

Мутация Glu104Asp является наиболее частой, на нее приходится примерно 80% клинического дефицита TPI. Были идентифицированы и другие мутации, в основном у сложных гетерозигот. Иногда эти мутации могут приводить к отсутствию неврологической дегенерации (например, мутации Ile170Val и Phe240Leu) или ее задержке (мутации Cys41Tyr, и Val231Met), что может, в свою очередь, приводить к увеличению продолжительности жизни. Примечательно, что у людей с гетерозиготной мутацией клинические симптомы не проявляются, даже если остаточная активность TPI в эритроцитах снижена примерно до 50% по сравнению с ее нормальной активностью [39, 40].

Различная степень тяжести состояния не всегда коррелирует со степенью снижения активности фермента, так же, как и активность фермента не имеет прямой связи с генотипом. Известны случаи заболевания, когда дефицит TPI не приводил к гемолитической анемии [163] или неврологическим расстройствам. Наиболее красноречиво это было продемонстрировано на примере двух братьев, имеющих одни и те же унаследованные мутации, приводящие к почти одинаковому снижению активности TPI и повышению уровня DAP, однако неврологические расстройства проявлялись только у одного из братьев. У данных пациентов были выявлены другие различия, которые могут давать вклад в патогенез заболевания, такие как разные уровни антиоксидантов в эритроцитах, активность TPI в лимфоцитах, различия в текучести мембраны эритроцитов и в молекулярном составе подклассов фосфолипидов [38, 42].

Диагностика дефицита TPI основывается на выявлении снижения ферментативной активности фермента (до 2-30% от нормальных значений) и 15-100-кратного увеличения концентрации DAP в эритроцитах. Проводится биопсия мышц и нерва, на которых проявляются миопатические изменения и аксональная невропатия, соответственно. Идентификация генотипа является прогностическим фактором продолжительности жизни [164].

В настоящее время специфического лечения дефицита TPI не существует, проводится симптоматическая поддерживающая терапия. Есть исследования, демонстрирующие теоретическую пользу фермент-заместительной терапии. В работе [165] было показано увеличение активности TPI и уменьшение концентрации DAP более чем в два раза в лимфоцитах пациента с дефицитом TPI после трансфузии лейкоредуцированной (с удаленным лейкотромбослоем) эритроцитарной массы с нормальной активностью TPI. Также ведутся исследования по разработке стабилизаторов мутантного белка TPI. В недавних исследованиях было показано, что препараты ресвератрол и итавастатин являются химическими модуляторами стабильности мутантных TPI и могут способствовать увеличению активности TPI. Обработанные этими препаратами клетки пациентов с компаудной мутацией Q181P/E105D [163] и с гомозиготной мутацией E105D [166] демонстрирровали повышенные уровни белка TPI в вестерн-блот анализе.

Фосфоглицераткиназа. Дефицит фосфоглицераткиназы (PGK), вызванный мутациями в гене, кодирующем изоформу фермента PGK1, также является редким нарушением и наследуется как сцепленный с X-хромосомой генетический признак [132]. Заболевание полностью выражено только у мужчин гемизигот (которые имеют только один аллель данного гена вместо двух), получивших от матери «испорченную» копию гена. Однако в некоторых случаях у гетерозиготных женщин также может быть гемолитическая анемия. PGK1 катализирует превращение 1,3-дифосфоглицерата (1,3-DPG) в 3-фосфоглицерат (3-PG), осуществляя при этом перенос высокоэнергетического фосфата с 1,3-DPG на ADP с образованием ATP. Реакция легко обратима. Изофермент PGK1 экспрессируется во всех соматических клетках и представляет собой мономерный фермент с молекулярной массой 48 кДа. Возможно, причина гемолиза при дефиците PGK1 связана с повышением кислотности или ингибированием некоторых других гликолитических ферментов (таких как гексокиназа, фосфофруктокиназа и пируваткиназа) [48]. В эритроцитах наблюдается повышение внутриклеточной концентрации 2,3-DPG [167–169] и DAP [169].

Гемолитическая анемия при дефиците PGK часто сопряжена с миопатией и нарушениями центральной нервной системы. В настоящее время зарегистрировано около 50 случаев дефицита PGK [170–172]. Снижение активности фермента не коррелирует со степенью тяжести заболевания. Описаны случаи с остаточной активностью фермента в эритроцитах 2,7 % от нормы, при которых не наблюдалось гемолиза [173,174]. И наоборот, у некоторых пациентов со значительно более высокой активностью фермента в эритроцитах наблюдается тяжелый гемолиз [175]. Однако были обнаружены закономерности, связывающие клинические симптомы с молекулярными свойствами мутантных ферментов [54]. Лучшую корреляцию с клиническим фенотипом имели мутации, сильно нарушающие стабильность белка, но умеренно влияющие на кинетические свойства фермента (p.I47N, p.L89P, p.C316R, p.S320N и p.A354P). Под кинетическими свойствами имеются в виду константы реакции, катализируемой ферментом (кажущаяся константа Михаэлиса (K_M) и отношение к ней каталитической константы (k_{cat}/K_M)), показывающие эффективность превращения субстрата в продукт. У пациентов с этими мутациями

обнаруживаются гемолитическая анемия и неврологические расстройства, а также (за исключением варианта с мутацией p.A354P) отсутствует миопатия. Варианты с сильными нарушениями каталитической эффективности (мутации p.G158V, p.D164V, p.K191del, D285V, p.D315N и p.T378P) и термостабильности (все, кроме p.T378P) в основном связаны только с миопатией. Наконец, мутации, слабо влияющие на молекулярные свойства (p.R206P, p.E252A, p.I253T, p.V266M и p.D268N), коррелируют с широким спектром клинических симптомов.

Диагностика, как и в предыдущих случаях, основана на клинической картине в сочетании с биохимическими исследованиями, выявляющими низкую активность фермента PGK в эритроцитах и мышцах (ниже 23% и 25% от нормы, соответственно), а также на выявлении мутаций гена, кодирующего PGK1, с помощью генетического анализа.

Альдолаза. Очень редко в эритроцитах человека встречается дефицит фермента альдолазы. В настоящее время зарегистрировано около 10 случаев такого дефицита. Были идентифицированы три различных изофермента альдолазы: A, B и C [132]. В эритроцитах человека, а также в мышцах экспрессируются субъединицы альдолазы A, представляющие собой гомотетрамерный фермент с молекулярной массой 159 кДа, состоящий из 4-х субъединиц, по 40 кДа каждая. Этот фермент в гликолизе обратимо расщепляет фруктозо-1,6-дифосфат на две триозы: DAP и глицеральдегид-3-фосфат (GAP). Известно, что альдолаза эритроцитов связывается с F-актином [176] и N-концевой частью белка полосы 3 [177], что ингибирует ее активность [178]. Аутосомно-рецессивные мутации гена *ALDOA* могут приводить к дефициту альдолазы в эритроцитах и мышцах и, как следствие, к гемолитической анемии разной степени тяжести наряду с миопатией. Описаны случаи дефицита альдолазы A, при которых наблюдается гемолитическая анемия от легкой до умеренной степени с остаточной активностью альдолазы в эритроцитах около 5% без признаков миопатии [179]. У одного пациента из этих двух случаев была выявлена мутация в гене *ALDOA*, приводящая к замене аминокислоты аспарагина на глицин в 128 положении. Также была выявлена температурная нестабильность альдолазы в эритроцитах этих пациентов. Исследователи предположили, что при замене аспарагиновой кислоты на глицин, термолабильность альдолазы может быть обусловлена потерей отрицательного заряда, необходимого для сохранения конформационной стабильности фермента, особенно при высокой температуре [59]. Были выявлены и другие мутации в гене альдолазы, приводящие как к гемолитической анемии в сочетании с миопатией с эпизодами рабдомиолиза (клинического синдрома, при котором разрушаются ткани скелетных мышц) [180,181], так и к эпизодам рабдомиолиза без гемолитической анемии. В последнем случае остаточная активность альдолазы в эритроцитах составляла 9%, и также была выявлена температурная нестабильность альдолазы A в мышцах, но не в эритроцитах [182]. Стоит отметить, что в случаях дефицита альдолазы A гемолитическая анемия и рабдомиолиз часто проявляются на фоне инфекций верхних дыхательных путей, лихорадки или физических нагрузок [183,184].

Отличительными особенностями диагностики дефицита альдолазы являются снижение активности альдолазы A в эритроцитах и мышцах, наличие

мутаций в гене *ALDOA*, повышенные уровни фруктозо-1,6-дисфосфата и повышение K_M для этого субстрата в эритроцитах, пониженные концентрации DAP и GAP в эритроцитах, наличие температурной нестабильности фермента в сочетании с клиническими признаками гемолитической анемии и миопатии [179,180].

Гексокиназа. Дефицит гексокиназы (НК) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание. В настоящее время зарегистрировано до 30 случаев этого дефицита [185]. Гексокиназа представляет собой ключевой регуляторный фермент гликолиза в эритроцитах. Она катализирует необратимый перенос фосфата от АТР к глюкозе. Эритроциты содержат два изофермента НК: НК1 и НКR. Оба изофермента кодируются одним и тем же геном, расположенным на хромосоме 10. Изофермент НКR экспрессируется исключительно в эритроидных клетках, тогда как НК1 присутствует в различных тканях млекопитающих. Как и при дефиците большинства гликолитических ферментов эритроцитов, тяжесть гемолиза варьирует от тяжелого неонатального гемолиза и смерти до полностью компенсированной хронической гемолитической анемии. Более того, не всегда остаточная активность фермента и наличие определенной мутации коррелируют со степенью тяжести анемии. В работе [185] было показано, что только одному из братьев с одинаковой мутацией требовались регулярные трансфузии. Иногда снижение активности НК у пациентов до 30% от нормы приводило лишь к легкому гемолизу без трансфузионной зависимости, тогда как при нормальной активности НК наблюдалась тяжелая гемолитическая анемия с транфузионной зависимостью. Такая картина наблюдалась у пациентов с мутациями в гене, кодирующем НК1, c.493-1G N>A и c.2599C>T, соответственно. Для разных мутантных белков в разной степени характерно высокое сродство к АТР, низкое сродство к глюкозе наряду со сниженной температурной стабильностью. Для пациентов с дефицитом НК характерно понижение уровня 2,3-DPG в эритроцитах.

Другие ферменты гликолиза. Один-два случая гемолитической анемии были зарегистрированы в результате дефицитов енолазы [186] и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH) [187]. Однако полученные данные неоднозначны и малоинформативны.

Таким образом, разнообразие клинических признаков, связанных с различными ферментопатиями, независимо от лежащего в их основе молекулярного механизма, демонстрирует, что фенотип наследственных ферментопатий эритроцитов зависит не только от молекулярных свойств мутантных белков. Клинические проявления дефектов ферментов отражают сложные взаимодействия дополнительных факторов, включая генетический фон, сопутствующие функциональные полиморфизмы других ферментов, посттрансляционные или эпигенетические модификации, неэффективный эритропоэз и различия в работе селезенки.

Ферментопатии в антиоксидантной системе эритроцита

К антиоксидантной системе эритроцита можно отнести пентозофосфатный путь, метаболизм глутатиона и группу антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза.

В пентозофосфатном пути (ПФП) (рисунок 5) глюкозо-6-фосфат подвергается окислению с последующей серией реакций с образованием фруктозо-6-фосфата, глицеральдегид-3-фосфата и NADPH [188]. ПФП является основным источником восстановленной формы NADPH, который необходим для восстановления окисленного глутатиона и некоторых сульфгидрильных групп белков. Восстановленный глутатион (GSH) защищает эритроциты от окислителей, включая перекись водорода (H_2O_2), супероксидные анион-радикалы ($O_2^{\bullet-}$) и гидроксильные радикалы ($OH^{\bullet}$), которые образуются как побочные продукты окисления гемоглобина кислородом или продуцируются эритроцитами после воздействия некоторых агентов. Накапливаясь в клетке, активные формы кислорода повреждают клеточные белки и липиды, поэтому клетке необходимо их дезактивировать. Образующиеся супероксидные радикалы превращаются в менее реакционноспособную перекись водорода под действием медьсодержащего фермента супероксиддисмутазы (СОД). H_2O_2 под действием глутатионпероксидазы и восстановленного глутатиона превращается в H_2O, при этом образуется окисленный глутатион (GSSG). Уровни GSH восстанавливаются глутатионредуктазой при участии NADPH, который при этом окисляется до NADP. NADP, в свою очередь, стимулирует ПФП для регенерации NADPH. Тесная связь метаболизма глутатиона с ПФП защищает зрелые эритроциты от окислительного стресса. Перекись водорода также может быть разложена на воду и кислород под действием каталазы и пероксиредоксина.

Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа. Наиболее распространенным нарушением пентозофосфатного пути, вызывающим гемолитическую анемию, является дефицит глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PDH). Этот фермент катализирует окисление глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконолактона, который быстро гидролизуется до 6-фосфоглюконовой кислоты с образованием одной молекулы NADPH. Затем 6-фосфоглюконовая кислота декарбоксилируется ферментом 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (6PGDH) с образованием рибулозо-5-фосфата (предшественника DNA, RNA и ATP) и сопутствующим образованием другой молекулы NADPH [132,189]. Активность G6PDH играет ключевую роль в регуляции окислительно-восстановительного состояния эритроцита, поскольку ПФП является единственным источником NADPH в эритроците.

Дефицит G6PDH является наиболее распространенным наследственным нарушением метаболизма эритроцитов, от которого в мире страдают более 500 миллионов человек [72].

Глобальная распространенность дефицита G6PDH географически коррелирует с районами, населенными популяциями, исторически подверженными эндемичной малярии, включая Африку, Средиземноморскую Европу, Юго-Восточную Азию и Латинскую Америку. На территории Российской Федерации дефицит определяется приблизительно у 2% населения [190].

G6PDH активна в эритроцитах в форме димера или тетрамера. Агрегация неактивных мономеров в каталитически активные димеры требует присутствия NADP [191]. NADP связан с ферментом как структурный компонент на границе раздела субъединиц и как один из субстратов реакции. Описано более 230 мутаций в гене, кодирующем G6PDH, вызывающих

гемолитическую анемию [189]. Поскольку ген сцеплен с Х-хромосомой (локализован в локусе Xq28), дефицит G6PDH, в первую очередь, проявляется у мужчин. Большинство мутаций представляют собой аминокислотные замены, которые влияют на кинетику фермента, его стабильность или и то и другое [192]. Все варианты полиморфного гена, кодирующего дефицит G6PDH, связаны с гемолитическим риском, но диапазон тяжести гемолиза различается для каждого варианта.

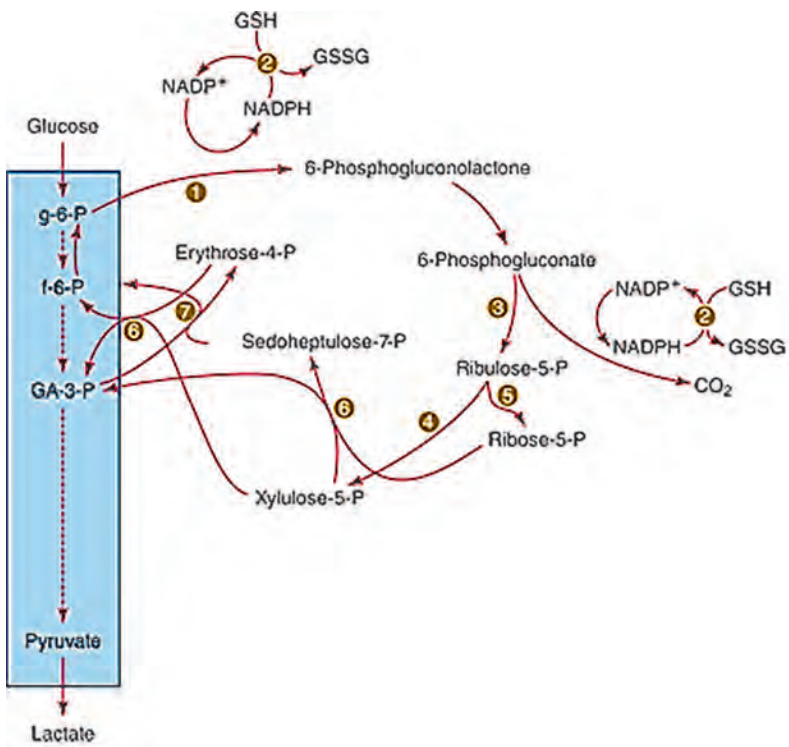

Рисунок 5. Схема пентозофосфатного пути [132]
Ферменты, катализирующие представленные реакции: (1) глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, (2) глутатионредуктаза, (3) фосфоглюконатдегидрогеназа, (4) рибулозофосфатэпимераза, (5) рибозофосфатизомераза, (6) транскетолаза и (7) трансальдолаза.

В 2022 году ВОЗ пересмотрела классификацию дефицитов G6PDH и выделила 4 группы дефицитов G6PDH в зависимости от медианы остаточной активности фермента, выраженной в процентах от нормальной активности [193]:

тип A (остаточная активность фермента <20 %) – хроническая гемолитическая анемия;

тип B (остаточная активность <45 %) – острая гемолитическая анемия, вызванная тригерром;

тип C (остаточная активность от 60 до 150%) – гемолиз отсутствует;

тип U, неопределенное клиническое значение.

В большинстве случаев дефицит протекает бессимптомно, до тех пор пока не появляются факторы, оказывающие чрезмерный окислительный стресс, что может вызвать острую гемолитическую анемию. Эти факторы включают различные инфекции, потребление бобов («фавизм») и ряда лекарств, в том числе нескольких противомалярийных. Полный список лекарств, которые вызывают гемолитическую анемию у людей с дефицитом G6PDH, был опубликован Итальянской ассоциацией дефицита G6PDH (на сайте www.g6pd.org). Было показано, что дефицит 6PGL совместно с дефицитом G6PDH может усугублять или провоцировать гемолиз [194].

Диагностика дефицита сводится к измерению активности фермента в эритроцитах и выявлению мутации в гене, кодирующем G6PDH. За исключением острых гемолитических эпизодов, больные с дефицитом G6PDH не нуждаются в какой-либо специальной терапии. При возникновении эпизодов гемолиза внимание уделяется осложнениям гемолиза. Людям с дефицитом G6PDH рекомендуется избегать факторов, провоцирующих окислительный стресс.

Было зарегистрировано также несколько случаев легкого гемолиза в результате дефицита 6-фосфоглюконатдегидрогеназы [195,196].

Метаболизм глутатиона. Биосинтез восстановленного глутатиона (GSH) происходит в два ATP-зависимых этапа [132]:

1) Глутамат +цистеин +ATP ↔ γ-глутамилцистеин +ADP +Pi;

2) γ-глутамилцистеин + глицин + ATP → GSH + ADP + Pi,

где Pi – ион неорганического фосфата.

Первый этап лимитирует общую скорость биосинтеза и катализируется γ-глутаматцистеинлигазой (GCL). Ингибирование GCL с помощью GSH по принципу обратной связи считается ключевым этапом регуляции гомеостаза GSH. Второй этап синтеза GSH является необратимым и опосредуется глутатионсинтетазой (GS).

Глутатионсинтетаза. Дефицит GS, относящийся ко второй реакции синтеза глутатиона, является наиболее частым нарушением метаболизма GSH, связанным с гемолитической анемией. Дефицит глутатионсинтетазы является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, приводящим к низкому уровню восстановленного глутатиона и повышенной восприимчивости к окислительному стрессу. Заболевание вызвано мутацией гена *GSS*, расположенного на хромосоме 20q11.2.

Было описано примерно 30 мутаций у 70 человек во всем мире с дефицитом GS [197]. В зависимости от клинических проявлений фенотипы пациентов можно разделить на легкие, умеренные или тяжелые. У пациентов с легкой степенью тяжести единственным клиническим симптомом является гемолитическая анемия, у пациентов с умеренным поражением также наблюдается метаболический ацидоз, а у пациентов с тяжелым поражением дополнительно наблюдается прогрессирующая дисфункция центральной нервной системы. Низкий уровень глутатиона при умеренной или тяжелой степени тяжести приводит к 5-оксопролинурии из-за накопления γ-глутамилцистеина, который гидролизуется до 5-оксопролина и цистеина под действием γ-глутамилциклотрансферазы. Это накопление 5-оксопролина приводит к высокой экскреции 5-оксопролина с мочой, что обнаруживается при анализе мочи на органические кислоты. Мутации, вызывающие сдвиг

рамки считывания и преждевременные стоп-кодоны, были обнаружены только у пациентов с умеренным или тяжелым поражением [198].

Диагноз ставится на основании клинической картины, низкого уровня глутатиона (5-20% от нормы) и активности GS (1-30% от нормы) в эритроцитах и/или культивируемых фибробластах кожи, а также при обнаружении повышенных концентраций 5-оксопролина в моче [197]. Гетерозиготные носители не имеют клинических признаков заболевания, но активность GS в культивируемых фибробластах у них снижена примерно до 50% от контрольных значений. Диагноз может быть подтвержден мутационным анализом. Лечение состоит из коррекции ацидоза, переливания крови и приема антиоксидантов. Было показано, что раннее добавление в терапию витаминов С и Е может улучшить долгосрочный клинический результат [199].

γ-Глутамилцистеинсинтетаза. Дефицит γ-глутамилцистеинсинтетазы, фермента, катализирующего первую реакцию синтеза глутатиона – более редкое заболевание, которое передается также по аутосомно-рецессивному типу. Во всем мире было зарегистрировано 9 таких пациентов в семи семьях [197].

γ-Глутамилцистеинсинтетаза человека представляет собой димер, состоящий из тяжелой (γ-GCSh) и легкой (γ-GCSI) субъединиц. Эти субъединицы кодируются двумя генами *GLCLC* и *GLCLR*, соответственно. Тяжелая субъединица проявляет каталитическую активность и отвечает за ингибирование синтеза под действием GSH по типу обратной связи. Легкая субъединица каталитически неактивна, но играет важную регуляторную роль [200]. Для пациентов характерно снижение уровня глутатиона и активности γ-глутамилцистеинсинтетазы в эритроцитах до 0-50% от нормы [201–203]. У всех пациентов наблюдается хроническая гемолитическая анемия разной степени тяжести. Кроме гемолитической анемии, у некоторых пациентов наблюдалась периферическая невропатия, миопатия и аминоацидурия [204]. Диагностика проводится путем измерения активности γ -глутамилцистеинсинтетазы в эритроцитах и мутационного анализа.

Было показано, что дефицит глутатиона в эритроцитах приводит к дефициту глутатион-S-трансферазы (GST) в эритроцитах [202,203,205]. Исследователями Beutler E. и др. было высказано предположение, что дефицит GST в эритроцитах больных обусловлен нестабильностью этого фермента при отсутствии адекватных внутриклеточных уровней глутатиона (глутатион стабилизирует GST *in vitro*) [203]. Однако точная роль глутатион-S-трансферазы в эритроцитах не установлена.

Описаны единичные случаи дефицита глутатионредуктазы без клинических проявлений и случай с практически полным отсутствием активности глутатионредуктазы, при котором наблюдались гемолитические кризы только при употреблении в пищу фасоли (аналогично G6PDH) [206,207].

Снижение активности глутатионпероксидазы аналогично не имеет клинического эффекта [208], а полная потеря активности глутатионпероксидазы у мышей не приводит к каким-либо последствиям даже при высоких уровнях окислительного стресса [209]. Гемолитическая анемия в результате дефицитов супероксиддисмутазы и каталазы также не была зарегистрирована.

Ферментопатии в метаболизме нуклеотидов

ATP имеет решающее значение для поддержания структуры и функции эритроцитов. В отличие от большинства клеток, человеческие эритроциты не способны синтезировать пурины *de novo* и используют в качестве субстратов для синтеза AMP, аденозин (в аденозинкиназной реакции) или аденин (в аденинфосфорибозилтрансферазной реакции). ATP является одним из компонентов внутриклеточного пула аденилатов, представляющего собой сумму ATP+ADP+AMP. Равновесие между компонентами пула аденилатов поддерживается в быстрой обратимой аденилаткиназной (АК) реакции:

2 [ADP] ↔ [ATP]+[AMP].

Концентрация ATP в эритроцитах стабилизируется благодаря отрицательной обратной связи между концентрацией ATP и скоростью гликолиза [210]. При этом концентрация ATP в эритроцитах разных доноров может отличаться более чем вдвое [211]. Индивидуальные различия в абсолютной концентрации ATP, которая стабилизируется в эритроцитах разных доноров, обусловлены различиями в величине пула аденилатов. Эта величина в клетках может меняться за счет синтеза или разрушения AMP, который связан с другими компонентами пула аденилатов (ATP и ADP) через аденилаткиназную реакцию. AMP может необратимо дезаминироваться аденозиндезаминазой (ADA), образуя инозинмонофосфат, или дефосфорилироваться 5’-нуклеотидазой с образованием аденозина [212, 213]. В последнем случае аденозин быстро дезаминируется высокоактивной аденозиндезаминазой с образованием гипоксантина, что делает этот путь разрушения AMP также необратимым. ADA играет регуляторную роль в поддержании концентрации аденозинрибонуклеотидов в эритроцитах.

Аденилаткиназа. Хроническая гемолитическая анемия, связанная с дефицитом аденилаткиназы (АК) в эритроцитах – редкое заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Всего описано около 15 случаев такого дефицита [214]. Аденилаткиназа человека существует в виде 9 различных изоферментов, обозначаемых от АК1 до АК9. В гене, кодирующем изофермент АК1, идентифицировано 11 мутаций. АК1 экспрессируется в скелетных мышцах, головном мозге и эритроцитах [215]. Во всех случаях заболевания, кроме одного [216], дефицит был связан с гемолитической анемией от умеренной до тяжелой степени. Гетерозиготное наследование не сопровождается заболеванием (наблюдается снижение активности АК до 50%) [217]. Гомозиготы или составные гетерозиготы проявляют умеренную или тяжелую гемолитичекую анемию с уровнем гемоглобина от 80 до 90 г/л. У некоторых пациентов наблюдалась умственная отсталость и психомоторные нарушения. Есть основания полагать, что существует корреляция между активностью фермента и проявлением неврологических нарушений [214]. Предполагается [214], что мутация сдвига рамки считывания (c.223dupA) может быть связана с нейропатогенностью, вызванной дефицитом АК1. Механизм возникновения гемолиза эритроцитов при дефиците АК до конца не ясен: в ранее зарегистрированных случаях дефицита АК общий пул адениновых нуклеотидов был нормальным или повышенным [218,219], однако

в случае [219] наблюдалось повышенное содержание ADP относительно суммы адениновых нуклеотидов (20% вместо 14% в контроле). Исследования ряда рекомбинантных белков [220] выявили сильно измененные каталитические свойства или стабильность белка в результате мутаций АК1.

Дефицит АК1 в зарегистрированных случаях был диагностирован на основании низкой ферментативной активности и выявления мутации в гене, кодирующем АК1, расположенном на хромосоме 9q34. В качестве терапии проводят трансфузии донорской эритроцитарной массы по мере необходимости, в некоторых случаях положительный эффект дает спленэктомия [217].

Аденозиндезаминаза. Повышенная активность аденозиндезаминазы (ADA) связана с наследственной несфероцитарной гемолитической анемией. Это единственное нарушение ферментов эритроцитов, которое наследуется по аутосомно-доминантному типу [221]. Впервые такое нарушение было обнаружено в 1970 году в одной семье (у 11 из 23 человек), в которой в трех поколениях имела место наследственная гемолитическая анемия, связанная с выраженным снижением адениновых нуклеотидов и повышенной активностью аденозиндезаминазы в эритроцитах (в 45-75 раз). Позже сообщалось еще о нескольких случаях гемолитической анемии, сопряженной с высокой активностью аденозиндезаминазы в эритроцитах (увеличенной в 30-85 раз) [222–224]. Степень тяжести анемии варьирует от легкой [221] до тяжелой [222]. Было показано, что избыточная активность ADA в эритроцитах обусловлена аномальным количеством каталитически и иммунологически нормального фермента. Гиперактивность аденозиндезаминазы приводит к истощению ATP эритроцитов: пул адениновых нуклеотидов у больных в среднем составлял около 50-60% от нормального среднего значения в контроле [221, 222]. У пациентов с повышенной активностью ADA существует трехкратное повышение активности 5'-пиридиннуклеотидазы эритроцитов, а также нормальные или пониженные уровни гликолитических интермедиатов [221, 225]. Показано заметное количество мРНК ADA в ретикулоцитах у людей с повышенной активностью фермента в эритроцитах, в то время как у здоровых людей мРНК ADA в ретикулоцитах отсутствовала. Этот факт указывает на то, что специфическая для эритроцитов сверхэкспрессия ADA происходит на уровне мРНК [222], вызывающей перепроизводство структурно нормального фермента [226]. Вероятно, гиперактивность является результатом цис-действующей мутации вблизи гена, кодирующего ADA [224].

Пиримидин-5'-нуклеотидаза. Пиримидин 5'-нуклеотидаза-1 (P5'N1) опосредует утилизацию пиримидиновых рибонуклеотидов (уридинмонофосфата (UMP) и цитидинмонофосфата (CMP)), образующихся в результате деградации РНК при созревании ретикулоцитов. Она катализирует дефосфорилирование пиримидиновых нуклеозидмонофосфатов в соответствующие нуклеозиды (цитидин и уридин), которые свободно диффундируют через мембрану. Для активности фермента требуются ионы Mg^{2+}. Ингибируется фермент рядом тяжелых металлов, включая Pb^{2+} [132]. P5'N1 представляет собой мономерный белок, который кодируется геном *NT5C3A* на хромосоме 7p14.3.

Дефицит пиримидин-5'-нуклеотидазы является третьей наиболее распространенной ферментопатией после глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

и пируваткиназы, вызывающей наследственную несфероцитарную гемолитическую анемию [227]. Сообщалось о более чем 100 случаях дефицита P5′N1. Заболевание передается по аутосомно-рецессивному типу. К настоящему времени идентифицировано около 30 различных мутаций этого фермента [132]. Наблюдаемая обычно степень гемолиза бывает от легкой до умеренной. Диапазон возраста на момент постановки диагноза от 3 до 64 лет [228]. Клинические проявления включают обычные признаки хронического гемолиза на протяжении всей жизни. Отличительным признаком дефицита этого фермента является наличие выраженной базофильной зернистости эритроцитов в мазке периферической крови, однако это неспецифический признак, который может не проявляться в крови, собранной в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта. У пациентов наблюдается накопление пиримидиновых нуклеотидов в эритроцитах, характеризующееся пониженным отношением пурин/пиримидин [228]. Дефицит P5'N1 является единственной ферментопатией в эритроцитах, при которой морфология эритроцитов помогает в постановке диагноза. Корреляции между остаточной активностью фермента и степенью гемолиза не обнаружено [227]. Для мутаций c.187T>C, c.469G>C и c.740T>C было показано снижение каталитической активности мутантных ферментов более чем в 200 раз, повышение значений K_M (в 10-25 раз), а также температурная нестабильность мутантных ферментов [229]. Однако, несмотря на существенные изменения кинетических параметров и параметров термостабильности, у пациентов с мутациями L131P и G230S обнаруживаются лишь умеренные изменения активности ферментов эритроцитов [230].

В эритроцитах присутствует также вторая пиримидин-5'-нуклеотидаза (P5'N2), активность которой обычно измеряют вместе с активностью P5'N1. Этот фермент (P5'N2) кодируется отдельным геном, проявляет небольшую гомологию с P5'N1 и не является строго специфичным для пиримидинов. Он не способен компенсировать отсутствие функции P5'N1 [231].

Точный механизм, приводящий к гемолизу эритроцитов с дефицитом P5'N1, неизвестен. Некоторые предполагаемые патофизиологические механизмы связывают накопление пиримидиновых нуклеотидов с изменениями мембраны эритроцитов из-за повышенных уровней цитидиндифосфат (ЦДФ)-холина и ЦДФ-этаноламина [232], а также со снижением активности пентозофосфатного пути [233] (данные противоречивы [234]), и хелатированием ионов Mg^{2+}[235], которые служат кофактором для ряда ферментов. Возможно, патофизиологический механизм связан со снижением активности фосфорибозилпирофосфатсинтетазы [236] и повышением активности пиримидиннуклеозидмонофосфаткиназы [237]. Однако точно причинно-следственные связи на сегодня не установлены. Особенности различных ферментопатий в эритроцитах представлены в таблице 7.

Таблица 7. Ферментопатии в эритроцитах

Дефицит фермента в эритроцитах (по мере убыли распространенности)	**Распространенность**	**Характерные признаки**
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (G6PDH)	Около 500 млн. случаев в мире (2,9% населения)	Гемолиз в результате факторов, вызывающих окислительный стресс; пониженный уровень глутатиона в эритроцитах.
Пируваткиназа (PK)	3,2-8,5 случаев на 1 000 000 человек	Увеличение уровня 2,3-DPG, повышенные уровни фосфоенолнирувата и экспрессии изофермента PKM_2 в эритроцитах пациентов.
Пиримидин 5'-нуклеотидаза (P5'N)	Около 100 зарегистрированных случаев в мире	Базофильная зернистость эритроцитов в мазке периферической крови; повышенные уровни цитидиндифосфат (ЦДФ)-холина и ЦДФ-этаноламина => пониженное отношение пурин/пиримидин.
Глюкозо-6-фосфатизомераза (GPI)	Около 90 зарегистрированных случаев	Выраженная температурная нестабильность фермента в большинстве случаев; повышение уровня глюкозо-6-фосфата (G6P) и снижение концентрации фруктозо-6-фосфата (F6P) и фруктозо-1,6-дифосфата (FDP) в эритроцитах. В дополнение к анемии могут наблюдаться нервно-мышечные симптомы.
Фосфофруктокиназа (PFK)	Около 100 зарегистрированных случаев	Легкий гемолиз, который не всегда сопровождается снижением уровня гемоглобина в крови. Повышение уровней гексозомонофосфатов и снижение 2,3-DPG в эритроцитах.
Глутатионсинтетаза (GS)	Около 70 зарегистрированных случаев	Низкий уровень глутатиона; накопление γ-глутамилцистеина => 5-оксопролинурия; в тяжелых случаях в дополнение к анемии могут наблюдаться метаболический ацидоз и прогрессирующая дисфункция центральной нервной системы.
Триозофосфатизомераза (TPI)	Около 50 зарегистрированных случаев	Нестабильность мутантного фермента; повышенный уровень дигидроксиацетонфосфата (DAP) в эритроцитах; в дополнение к анемии может наблюдаться прогрессирующая нервно-мышечная дисфункция; наиболее тяжелый дефект из ферментативных дефицитов гликолитического пути.
Фосфоглицераткиназа (PGK)	До 50 зарегистрированных случаев	Нарушение сцеплено с Х-хромосомой, полностью выражено только у мужчин гемизигот; повышение концентрации 2,3-DPG в эритроцитах; гемолитическая анемия часто сопряжена с миопатией и нарушениями центральной нервной системы.
Гексокиназа (HK)	До 30 зарегистрированных случаев	Снижение 2,3-DPG в эритроцитах

Продолжение таблицы 6

Аденозиндезаминаза (ADA)	До 20 зарегистрированных случаев	Повышенная активность аденозиндезаминазы; аутосомно-доминантный тип наследования; снижение пула адениновых нуклеотидов в эритроцитах до 50-60% от нормы; повышенное количество мРНК ADA в ретикулоцитах пациентов.
Аденилаткиназа (AK)	Около 15 зарегистрированных случаев	Нормальный или повышенный пул адениновых нуклеотидов; сильно измененные каталитические свойства или стабильность белка.
Альдолаза	Около 10 зарегистрированных случаев	Повышенный уровень фруктозо-1,6-дисфосфата и пониженные уровни дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата в эритроцитах; наличие температурной нестабильности фермента; в дополнение к анемии может наблюдаться миопатия.
γ-Глутамилцистеинсинтетаза	9 зарегистрированных случаев	Снижение уровня глутатиона и активности γ-глутамилцистеинсинтетазы в эритроцитах до 0-50% от нормы; кроме анемии, у некоторых пациентов наблюдалась периферическая невропатия, миопатия и аминоацидурия.

Вопросу о механизмах возникновения гликолиза при ферментопатиях гликолитических ферментов эритроцитов посвящена теоретическая работа [238]. Предполагается, что аномальный фермент со сниженной активностью замедляет поток гликолиза, препятствуя выработке клетками энергии со скоростью, необходимой для поддержания их жизнеспособности, и тем самым вызывая разрушение эритроцитов и анемию. Нормальные эритроциты имеют дисковидную форму, поэтому отношение площади их поверхности к объему высокое. Дисковидная форма эритроцитов обеспечивает оптимальные реологические характеристики этих клеток. Поскольку мембрана эритроцита нерастяжима, ее форма должна поддерживаться механизмами, стабилизирующими объем клетки. Этот объем поддерживается практически постоянным за счет работы транспортной Na^+,K^+-АТРазы, использующей энергию, образующуюся при гликолизе. При нарушении транспортной Na^+,K^+-АТРазы и/или гликолитических ферментов объем и, следовательно, реологические характеристики эритроцитов также будут нарушены. Это приводит к их удалению из кровотока или к осмотическому лизису [238]. В работе [238] с помощью математической модели гликолиза, анализирующей ответ эритроцита на увеличение или снижение активности различных ферментов, было показано, что при падении активности любого из гликолитических ферментов (кроме дифосфоглицератмутазы (DPGM)) до определенного минимума объем эритроцита увеличивается до тех пор, пока клетка не лизирует. Объем увеличивается либо из-за потери стационарного состояния, когда гликолиз становится неспособным обеспечить активный транспорт ионов (при дефиците HK, GPI, PFK и ALD), либо из-за увеличения стационарных концентраций осмотически активных метаболитов гликолиза (при дефиците TPI, PGK, DPGP, PGM, ENO, PK).

Диагностика гемолитической несфероцитарной анемии, обусловленная дефицитом ферментов в эритроцитах, основана на наличии характерной клинической картины гемолитической анемии, лабораторно подтвержденного гемолиза (снижение гаптоглобина, гипербилирубинемия, повышение лактатдегидрогеназы), снижении активности соответствующего фермента, а также на результатах проведенного молекулярно-генетического исследования с выявлением мутации в гене, кодирующем дефицитный фермент. Осмотическая резистентность эритроцитов неспецифична и, как правило, имеет нормальные значения, что не позволяет использовать этот метод для выявления ферментопатий [239, 240]. При морфологическом исследовании костного мозга при дефицитах пируваткиназы частой находкой являются расширенный эритроидный росток, множественные признаки дизэритропоэза, что трактуется как признаки врожденной дизэритропоэтической анемии и приводит к ошибочно уставленному диагнозу [240]. Описаны варианты термолабильных ферментов со снижением активности после инкубации при повышенных температурах (40-53^{0}C) [147, 241]. В некоторых случаях имеет смысл определение промежуточных соединений гликолитического пути для определения, предполагаемого дефицита [239]. Морфология эритроцитов полезна только в диагностике дефицита пиримидин-5'-нуклеотидазы из-за характерной зернистости эритроцитов [132].

Основу терапии дефицитов ферментов в эритроцитах составляют симптоматическая терапия наряду с гемотрансфузиями, в случае необходимости [132]. Хроническая трансфузионная терапия провоцирует перегрузку железом, поэтому обычно требует сопутствующей хелатирующей терапии. Спленэктомия – частое решение, принимаемое врачом в отношении пациентов с наследственной несфероцитарной гемолитической анемией. Однако, ответ на спленэктомию непредсказуем, у некоторых пациентов могут развиться серьезные тромботические [242] и другие осложнения. Рекомендации должны основываться на степени тяжести заболевания, семейном анамнезе реакции на спленэктомию и возможной необходимости холецистэктомии. В работе [242] было показано, что только у 50% детей с дефицитом РК удалось добиться трансфузионной независимости после спленэктомии. С недавнего времени появилась возможность терапии дефицита пируваткиназы у взрослых с помощью низкомолекулярного активатора РК (митапиват), который пока не зарегистрирован в России.

Мембранопатии

Мембрана эритроцита представляет собой фосфолипидный бислой, в который вкраплены белки и полисахариды [243]. С точки зрения реологии крови, в первую очередь важны механические свойства мембраны [244]. Мембрана клетки нерастяжима [245], однако легко меняет свою форму. Молекулы фосфолипидов, образующие мембрану, не фиксированы на своих местах, а свободно перемещаются вдоль поверхности мембраны и при этом занимают строго определенный объем. Как уже было сказано выше, для выполнения своей функции эритроциту необходимо быстро обратимо деформироваться и изменять свою форму в узких капиллярах.

Клетка, имеющая в качестве оболочки фосфолипидный бислой, будет легко деформируемой, если этому не будет препятствовать содержимое [244]. Если замкнутую фосфолипидную оболочку заполнить жидкостью по максимуму, то такая оболочка примет форму сферы. В результате чего получится жесткая конструкция, которую практически невозможно деформировать, не разорвав оболочку. Поэтому, чтобы эритроцит мог легко менять свою форму при прохождении через узкие капилляры, его объем должен быть заметно меньше максимального. И действительно, объем нормального эритроцита в 1,5-2 раза меньше максимального объема, который может вместиться в оболочку эритроцита [2]. Эритроцит, оболочка которого достаточно легко изгибается, а площадь вдвое превосходит минимальную для данного объема этой клетки, может принимать массу разных форм [244]. Попадая в узкий капилляр, он успевает принять его форму за доли секунды. Теоретические расчеты показали, как эластичность мембраны эритроцита влияет на его форму и, соответственно, деформируемость [246]. Наиболее энергетически и физиологически выгодную двояковогнутую форму эритроциты имеют благодаря наличию примембранного цитоскелета. С внутренней стороны мембраны эритроцита находится белковая сеть толщиной 40-90 нм. Главный белок этой сети – спектрин. Это большой фибриллярный белок, состоящий из двух субъединиц (α- и β-спектрина), образующих димер длиной в 100 нм. В клетке эти димеры объединяются в 200 нм тетрамеры. Спектрин связывается с мембраной клетки через комплексы интегральных белков мембраны [243]. Эти белки организованы в макромолекулярные комплексы, центр которых находится на белке полосы 3, анионообменном канале. Спектриновая сеть достаточно плотно подстилает бислойную мембрану, сильно увеличивая ее изгибную упругость. Мутации в разных цепях спектрина приводят к различным анемиям, при которых эритроциты теряют свою форму и превращаются в овалоциты или сфероциты [247], подтверждая тем самым описанный выше механизм, обеспечивающий эритроциту нужную форму.

Мембрана эритроцитов содержит примерно 20 основных белков и не менее 850 второстепенных [243]. Помимо спектрина, скелет состоит из актина и связанных с ним белков (тропомиозина, тропомодулина, аддуцина и дематина), белка 4.1R и анкирина. Анкирин-1 связывает β-спектрин и скелет мембраны с белком полосы 3, белком 4.2 и резус-ассоциированным гликопротеином (RhAG). Актиновые нити связывают спектрин (с помощью белка 4.1R), а также тропомиозин, тропомодулин, аддуцин, дематин и хореин (рисунок 6). Таким образом, белок 4.1R обеспечивает актин-спектриновую ассоциацию. Трансмембранные белковые комплексы, содержащие интегральные мембранные белки, такие как белок полосы 3, RhAG, белки периферической мембраны, анкирин и белок 4.2, обеспечивают «вертикальные» связи между цитоскелетом и липидным бислоем [248].

Белок полосы 3 – мембранный белок, канал анионного обмена (HCO^3- и Cl-), образует мембранные комплексы с белками, которые связаны со спектрином через анкирин-1 и белок 4.2, и связаны с актиновым соединительным комплексом через белок 4.1R, белок 4.2, p55, аддуцин и GLUT1, являющийся однонаправленным транспортным каналом для облегченного переноса глюкозы через мембрану эритроцита [243]. Примерно 40% молекул

белка полосы 3 представляют собой тетрамеры в комплексе с анкирином и другими интегральными белками вблизи сайта самоассоциации спектрина (анкириновый комплекс). Примерно такая же часть молекул белка полосы 3, вероятно, димеров, расположена вблизи соединения спектрин-актин и связывается со спектрином через белок 4.1R, белок 4.2 и аддуцин (это актиновый комплекс).

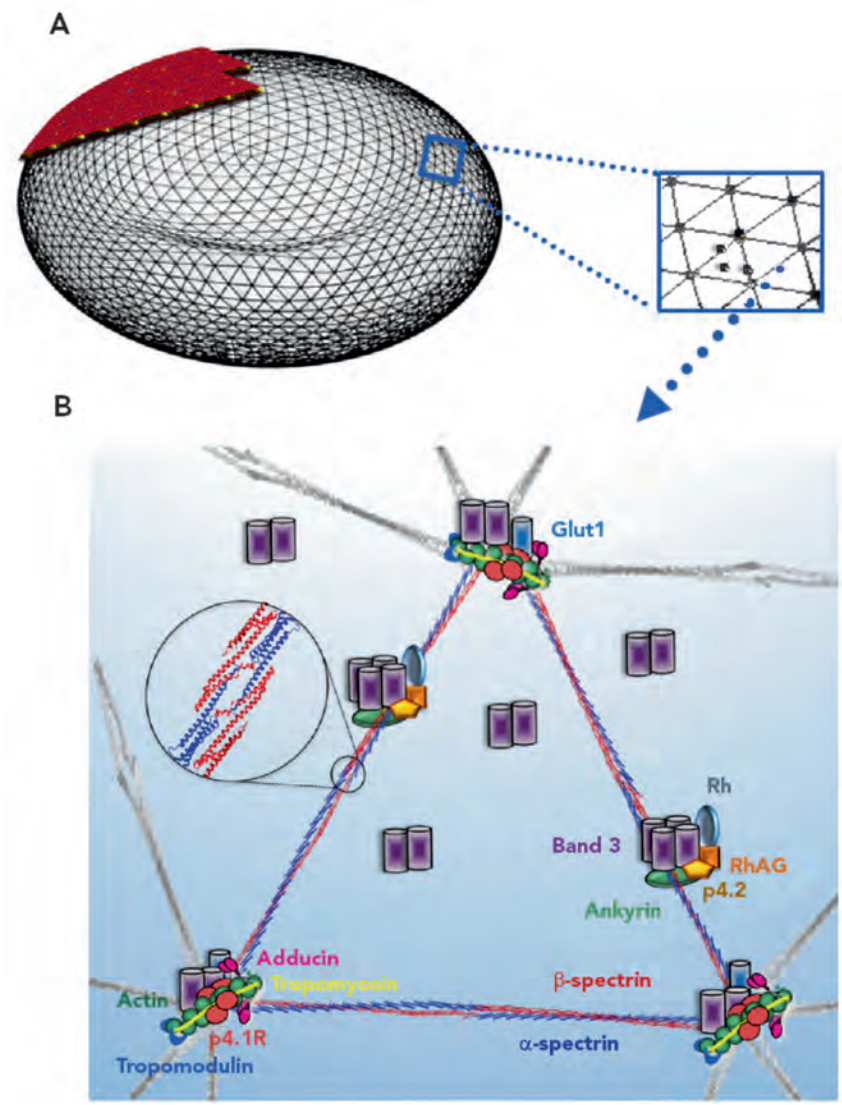

Рисунок 6. Модель мембраны эритроцита, представляющая структурные белки, мутации в которых могут вызывать мембранные нарушения

А. – Модель гексагональной решетки цитоскелета эритроцита, формирующей двояковогнутую форму эритроцита, поддерживающую липидный бислой. Часть поверхности цитоскелета показана справа увеличенной.

В. – Спектрин-гетеродимеры (из α и β спектрина) связываются «голова к голове», как показано слева в увеличенном фрагменте, чтобы образовать спектриновые тетрамеры, которые составляют стороны каждого треугольника в гексагоне. Каждая голова димера построена из N-терминальной области α-спектрина и С-терминальной области β-спектрина. Объединяющие комплексы в углах треугольников образованы олигомером актина, длина которого управляется тропомиозином, и белками аддуцином и тропомодулином. Белок 4.1R связывается с актином. Трансмембранные белковые комплексы содержат интегральные белки мембраны – белок полосы 3 и Rh-фактор-ассоциированный гликопротеин (RhAG), а также периферические мембранные белки анкирин и белок полосы 4.2 и обеспечивают вертикальные связи между цитоскелетом и липидным бислоем. С разрешения авторов [248].

Остальные димеры полосы 3 свободно плавают внутри липидного бислоя (несвязанный белок полосы 3). Белок полосы 3 также связывает пероксиредоксин, дезоксигемоглобин и образует комплексы с гликолитическими ферментами GAPDH, PFK, PGK, альдолазой, LDH и PK, а также переносит многие антигены групп крови. Гликолитические ферменты неактивны, когда связаны с белком полосы 3, но замещаются в нем и активируются либо дезоксигемоглобином, который также связывается с N-концом спектрина, либо фосфорилированием двух тирозинов в местах связывания [243]. Связывание дезоксигемоглобина с белком полосы 3 также снижает его связывание с анкирином, ослабляя, соответственно, взаимодействие мембраны с цитоскелетом, что во время длительных эпизодов дезоксигенации может приводить к везикуляции мембраны эритроцита [249]. Ферменты и ATP расположены дискретными скоплениями вдоль мембраны [250]. Условия, вытесняющие ферменты из мембраны, активируют гликолитические потоки в эритроцитах на 45% [243].

Механическая стабильность мембраны регулируется латеральными связями между димерами спектрина и комплексом спектрин-актин-белок 4.1R. Ослабление любой из этих связей приводит к снижению механической стабильности мембраны и фрагментации клеток. Ослабление вертикальных связей между липидным бислоем и цитоскелетом ведет к везикуляции мембраны и, как следствие этого, к потере площади поверхности клетки. Таким образом, чтобы сохранять избыточную площадь поверхности по отношению к объему клетки и, следовательно, легко деформироваться, эритроцитам необходимо сохранять механическую стабильность, т. е. вертикальные связи между липидным бислоем и цитоскелетом мембраны, на протяжении всей своей жизни в циркуляции. Мутации мембранных белков, которые приводят к ослаблению или потере этих связей, или к снижению механической стабильности мембраны, приводят к уменьшению площади поверхности мембраны, потере клеточной способности деформироваться и, в результате, к удалению таких недеформируемых эритроцитов из кровотока, в первую очередь селезенкой [248,251]. Это приводит к уменьшению продолжительности жизни клеток. У таких пациентов наблюдаются общие клинические

признаки гемолитической анемии. Наиболее распространенными нарушениями мембран эритроцитов являются наследственные сфероцитоз (HS), эллиптоцитоз (HE), пиропойкилоцитоз (HPP), ксероцитоз (HX), которые объединены общим диагностическим названием «наследственная гемолитическая анемия (ННА)».

Наследственный сфероцитоз (HS). HS является наиболее распространенным заболеванием мембраны эритроцитов во всем мире и наиболее распространенной наследственной гемолитической анемией у людей восточноевропейского происхождения с распространенностью от 1:1000 до 1:2500 человек [248]. Причиной нарушения является количественный дефицит α- или β-спектрина, анкирина, белка 4.2 или белка полосы 3, кодируемых генами *SPTA1*, *SPTB*, *ANK1*, *EPB42* и *SLC4A1*, соответственно. Мутации в этих генах приводят к нарушениям вертикальных связей между цитоскелетом и липидным бислоем и, как было сказано выше, к уменьшению отношения площади поверхности клетки к объему, что приводит к сферической форме эритроцита, его повышенной осмотической хрупкости и снижению деформируемости. Два различных пути приводят к уменьшению площади поверхности мембраны: (1) дефекты в спектрине, анкирине или белке 4.2 снижают плотность цитоскелета мембраны, дестабилизируя лежащий выше липидный бислой и высвобождая микровезикулы, содержащие белок полосы 3; (2) дефекты белка полосы 3 приводят к его дефициту и потере липидстабилизирующего эффекта, что приводит к освобождению из мембраны микровезикул без белка полосы 3. Оба пути приводят к уменьшению отношения площади поверхности мембраны эритроцита к его объему и образованию сфероцитов с пониженной деформируемостью, которые избирательно повреждаются в селезенке [247,252].

В 75% случаев HS наследуются доминантно (гетерозиготные мутации генов *ANK1*, *SLC4A1* и *SPTB)*, 25% случаев наследуются рецессивно (двуаллельные дефекты в генах *ANK1, EPB42, SPTA1)*. Мутации *de novo* также были описаны, чаще всего для гена *ANK1.*

Отличительной чертой HS является сильная вариабельность степени тяжести заболевания [251]. Интересно, что пациенты с одним и тем же генотипом могут иметь различия в фенотипе. Неоднородность уровня экспрессии из-за вариантов сплайсинга, вариабельность ответа эритропоэза, а иногда и различная переносимость анемии пациентами могут способствовать этому феномену. Тяжесть анемии напрямую связана со степенью потери площади поверхности мембраны и, как следствие, с увеличением сферичности клеток [129].

Дефицит анкирина является наиболее частой причиной HS, на которую приходится примерно 50-60% случаев с различной степенью тяжести анемии от легкой до тяжелой [129]. Мутации анкирина вызывают HS в ассоциации как с доминантными, так и с рецессивными формами наследования. Аутосомно-рецессивный *ANK1*-ассоциированный HS обычно возникает из-за нулевой мутации в *транс*-промоторе, или из-за интронного варианта, который активирует альтернативный сплайсинг и влияет на уровни экспрессии, или в результате миссенс-мутации, снижающей включение анкирина в цитоскелет [248]. У этих пациентов обычно наблюдается тяжелое, требующее переливания крови заболевание, отвечающее на спленэктомию [253].

Биохимический фенотип комбинированного дефицита спектрина и анкирина является распространенной аномалией, отмечаемой примерно у 40–65% пациентов с наследственным сфероцитозом в популяциях Северной Европы [254], но только в 5-10% случаев в Японии. Пациенты с дефектами анкирина имеют выраженный сфероцитоз без других морфологических аномалий. Анкирин-1 играет ключевую роль в стабилизации мембраны, обеспечивая основной сайт связывания липидного бислоя со скелетом мембраны на основе спектрина. Поскольку он связывает β-спектрин с белком полосы 3, дефицит анкирина приводит к пропорциональному снижению сборки спектрина на мембране, несмотря на его нормальный синтез. Дефицит одного белка строго связан с дефицитом другого, а степень дефицита белка связана с клинической тяжестью.

В 20-30% случаев HS связаны с изолированным дефицитом спектрина из-за мутаций либо в α-спектрине (5% пациентов с HS) , либо в β-спектрине (15-30% пациентов с HS) [251]. Дефекты α-спектрина клинически проявляются только в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. У этих больных заболевание тяжелое. Аллель α-*LEPRA* (аллель низкой экспрессии Прага (PRAgue)) производит примерно в шесть раз меньше правильно сплайсированного транскрипта α-спектрина, чем здоровый аллель. Это довольно низкое количество α-спектрина обеспечивает нормальную выживаемость эритроцитов у пациентов с *SPTA1*-ассоциированным HS после спленэктомии, указывая на то, что два нормальных аллеля *SPTA1* обычно продуцируют избыточные уровни белка (в частности, α-спектрин продуцируется в трехкратном избытке в сравнении с β-спектрином) [255]. Полный дефицит α-спектрина из-за биаллельных нулевых мутаций *SPTA1* приводит к наиболее тяжелой форме HS, проявляющейся фатальной водянкой плода при доношенной беременности [255]. Младенцы с таким генотипом могут выжить, если они родятся преждевременно, что позволяет провести раннюю трансфузионную поддержку или получить внутриутробные трансфузии. Для этого редкого типа HS характерна ретикулоцитопения. Спленэктомия значительно не улучшает крайне сниженную выживаемость эритроцитов с дефицитом спектрина [255]. Родители пациентов с HS, ассоциированным с мутацией *SPTA1*, даже при наличии одного нулевого аллеля *SPTA1,* бессимптомны. Мазки крови пациентов с тяжелым дефицитом α-спектрина содержат много микросфероцитов, «сморщенных» эритроцитов и аномальных пойкилоцитов, т. е. эритроцитов неправильной формы [254].

На дефекты β-спектрина приходится около 15-30% случаев наследственного сфероцитоза в популяциях Северной Европы. Пациенты с дефицитом β-спектрина обычно имеют заболевание от легкой до умеренной степени тяжести и не нуждаются в переливании крови [254]. Мазки крови пациентов могут содержать заметное число акантоцитов (эритроцитов зубчатой формы) или сфероцитов с шипами. Гомозиготные, истинно нулевые мутации *SPTB* не описаны, что указывает на то, что полный дефицит β-спектрина может быть несовместим с жизнью [248].

Примерно в 15-20% случаев HS молекулярной основой HS является количественный дефицит белка полосы 3 из-за доминантно наследуемых мутаций гена этого белка. У большинства пациентов с дефицитом белка полосы

3 наблюдается анемия от легкой до умеренной степени тяжести [129]. Сообщалось о тяжелом заболевании у пациентов, которые являются компаундными гетерозиготами или гомозиготами по дефектам белка полосы 3 [254].

Аутосомно-рецессивная мутация *EPB42,* приводящая к полному или почти полному отсутствию белка 4.2, приводит к уменьшению связывающегося с ним белка полосы 3 в мембране эритроцитов [248]. Этот тип HS обычно имеет легкую или среднюю степень тяжести и составляет от 40% до 50% HS в Японии, но <5% всех случаев HS в других популяциях. Гетерозиготные носители мутации *EPB42,* как правило, бессимптомны.

Дефект мембраны при HS приводит к множеству вторичных метаболических изменений. К ним относятся повышенный поток натрия и калия через мембрану HS [256], что приводит к усилению активации Na^{+}-K^{+}-АТРазы [257], ускоренному распаду АТР, усилению гликолиза, уменьшению 2,3-дифосфоглицерата и снижению внутриклеточного pH. Эритроциты при HS слегка дегидратированы, что ухудшает их деформируемость.

Диагностика HS проводится на основании сочетания клинического и семейного анамнеза, физического осмотра (на наличие спленомегалии или желтухи) и лабораторных данных (полный анализ крови, индексы и морфология эритроцитов, количество ретикулоцитов). Следует исключить другие причины анемии, особенно аутоиммунную гемолитическую анемию, врожденную дизэритропоэтическую анемию II типа и наследственный стоматоцитоз [254]. Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) при сфероцитозе превышает 360 г/л у половины пациентов из-за наличия дегидратированных эритроцитов. Сочетание средней концентрации клеточного гемоглобина с шириной распределения эритроцитов (сдвинутого в сторону мелких клеток) может почти однозначно указывать на HS [258]. Эритроциты около 25 % пациентов с HS демонстрируют нормальную осмотическую хрупкость [254]. После инкубации при 37°C в течение 24 ч площадь поверхности мембраны эритроцитов больных уменьшается. Инкубационный тест на осмотическую хрупкость считается золотым стандартом в диагностике наследственного сфероцитоза у пациентов со сфероцитарной гемолитической анемией. Однако тесты на осмотическую хрупкость имеют низкую чувствительность, поскольку пропускают около 20% легких случаев наследственного сфероцитоза. Осмотическая градиентная эктацитометрия является чувствительным методом диагностики HS, т. к. она выявляет характерное уменьшение площади поверхности мембраны во всех случаях HS [252]. Однако оборудование, необходимое для этого метода, доступно только в небольшом количестве лабораторий. Одним из методов для оценки HS является EMA-тест, который заключается в использовании эозин-5-малеимида (EMA), флуоресцентного красителя, который ковалентно связывается с лизином-430 на первой внеклеточной петле белка полосы 3, а также способен связываться с другими белками мембраны (Rh, RhAG, CD47). Было показано [259], что в эритроцитах пациентов с HS параметр флуоресценции, определяемый в тесте, сильно снижен по сравнению с эритроцитами здоровых людей. Однако сниженные показатели ЭМА-теста также наблюдались и для пациентов с Южно-Азиатским овалоцитозом (SAO) [259], пациентов с аутоиммуной гемолитической анемией [260] и нестабильным гемоглобином [260].

По данным исследования [260], специфичность ЭМА-теста для диагностики наследственного сфероцитоза составляет 80%: из 59 пациентов с HS показатель ЭМА-теста был снижен у 47 пациентов.

Количественное определение дефицитных белков в мембране эритроцитов может помочь в диагностике заболевания в атипичных случаях. Однако эти измерения трудно осуществить, поскольку необходимо точно измерить небольшие отклонения от нормы, поскольку количество дефицитного белка в мембранах эритроцитов может быть снижено лишь на 10-15% от нормы [254]. Самый простой метод – электрофорез белков мембран эритроцитов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), но этот метод выявляет аномалии только у 70-80% пациентов. Количества спектрина и анкирина-1 лучше всего оцениваются с помощью радиоиммуноанализа (RIA) или электрохемилюминесцентного иммуноанализа (EIA) [258]. Однако эти методы доступны только в нескольких специализированных лабораториях.

Секвестрация эритроцитов в селезенке является основным фактором, определяющим выживаемость эритроцитов у пациентов с наследственным сфероцитозом [261]. Спленэктомия эффективна почти для всех пациентов с этим заболеванием. Она устраняет симптомы анемии и снижет количество ретикулоцитов почти до нормы. Хотя пациенты с очень тяжелым заболеванием не полностью излечиваются спленэктомией, у них также заметно клиническое улучшение после удаления селезенки.

Наследственный эллиптоцитоз и пиропойкилоцитоз (HPP). Наследственный эллиптоцитоз (HE) характеризуется наличием эллиптических сигарообразных эритроцитов в мазке периферической крови [247] . Во всем мире заболеваемость HE оценивается в 1:(2000–4000), но она приближается к 1:100 в некоторых частях Африки (эндемичные районы малярии). Фактическая заболеваемость неизвестна, так как у большинства пациентов заболевание протекает бессимптомно. В 10% случаев пациенты с HE страдают гемолитической анемией [247] . Многие из этих пациентов являются гомозиготами или сложными гетерозиготами. HE наследуется по аутосомно-доминантному типу с редкими случаями мутаций de novo [262] . Заболевание вызвано гетерозиготными мутациями в генах, кодирующих α-спектрин (примерно 65% всех случаев HE), β-спектрин (около 30% случаев HE), белок 4.1R (5% всех случаев HE), гликофорин C. Мутации в генах α и β-спектринов (SPTA1 и SPTB, соответственно), вызывающие HE, производят измененные цепей спектрина, которые включаются в цитоскелет и ослабляют тетрамер спектрина [263] . Мутации в гене белка 4.1R (EPB41) приводят к измененному или дефицитному белку 4.1R, что ухудшает ассоциацию спектрин-4.1R-актин [262] . Редкие гомозиготные мутации в гене GYPC, вызывающие полный дефицит гликофорина C (фенотип Leach), также приводят к HE без значительного гемолиза из-за сопутствующего частичного дефицита 4.1R [264]. Дефектные «горизонтальные» связи в цитоскелете, вызванные мутациями HE, влияют на деформируемость и форму мембраны эритроцитов, при этом происходит постоянная деформация в эллиптоциты под действием напряжения сдвига [262]. Общим признаком всех форм HE является снижение механической стабильности мембраны, вызванное

ослаблением латеральных связей в скелете мембраны либо из-за дефектного взаимодействия димеров спектрина, либо из-за ослабления соединительного комплекса спектрин-актин-белок 4.1R [251]. Небольшое уменьшение мембраны механически приводит к прогрессивной трансформации дискоидных эритроцитов в эллиптоциты в течение жизни эритроцитов в кровообращении. Более сильное снижение механической стабильности мембраны приводит к фрагментации мембраны и образованию фрагментированных эритроцитов с уменьшенной площадью поверхности мембраны. Такие эритроциты обладают повышенной сферичностью и удаляются из кровотока селезенкой, что приводит к анемии. Степень снижения механической стабильности мембран напрямую связана с тяжестью анемии. НЕ характеризуется отсутствием анемии при наличии только эллиптоцитарных эритроцитов и умеренно тяжелой гемолитической анемией при наличии фрагментированных клеток с эллиптоцитами. Гетерозиготными мутации опосредуют легкую степень тяжести, двойные гетерозиготные или гомозиготные мутации вызывают более тяжелый фенотип заболевания.

Наследственный пиропойкилоцитоз (HPP) является редкой причиной тяжелой гемолитической анемии. Морфология эритроцитов, при этом заболевании напоминает таковую у пациентов после термического ожога [247]. Существует сильная связь между НЕ и HPP. До трети членов семей больных HPP имеют НЕ. У многих пациентов с HPP в детстве развивается тяжелая гемолитическая анемия, которая в более позднем возрасте (через 1-2 года) перерастает в типичный НЕ. Наиболее распространенная форма HPP, часто диагностируемая у младенцев африканского происхождения с неонатальной гипербилирубинемией, связана с мутацией c.6531-12C>T в аллеле гена SPTA1, известной как «α^{LELY}» [248]. Эта мутация приводит к 50% снижению экспрессии α-спектрина, что, однако, клинически не проявляется у нормальных людей даже в гомозиготном состоянии, поскольку α-спектрин вырабатывается в избытке, но при наличии дополнительно еще другой мутации SPTA1, вызывающей НЕ, мутации α^{LELY} приводят к увеличению относительного встраивания аномальной спектриновой цепи в цитоскелет, что снижает его стабильность. HPP также может быть вызван биаллельными мутациями, вызывающими НЕ, гомозиготными или компаундными (составными) гетерозиготными вариантами SPTA1, SPTB, EPB41 или аллелями каждого из SPTA1 и SPTB, несущими мутации НЕ [262,265]. Мазок крови при HPP характеризуется выраженным анизоцитозом (смещением ширины распределения эритроцитов по размеру в сторону уменьшения) и пойкилоцитозом с причудливыми микроцитами и фрагментированными клетками вместе с эллиптоцитами. Было обнаружено, что эритроциты пациентов с HPP обладают повышенной термической чувствительностью.

Отличительным признаком НЕ является наличие сигарообразных эллиптоцитов в мазке периферической крови. Нормохромные, нормоцитарные эллиптоциты могут насчитываться от нескольких до 100%, причем степень гемолиза не коррелирует с количеством присутствующих эллиптоцитов. Также можно увидеть сфероциты, стоматоциты и фрагментированные клетки. Однако эллиптоциты также могут наблюдаться в связи с другими нарушениями, включая мегалобластные анемии, гипохромные микроцитарные анемии, миелодиспластические синдромы и миелофиброз. Средний объем клеток (MCV)

для HE, как правило, находится в диапазоне70-90 фл, а для HPP в диапазоне 50-60 фл. Было обнаружено, что эритроциты при HPP демонстрируют более низкие показания флуоресценции в EMA-тесте, чем эритроциты с HS, в то время как эритроциты с HE демонстрируют нормальные показатели связывания с красителем в EMA-тесте [266]. Осмотическая хрупкость при тяжелых формах HE/HPP сильно отличается от таковой для здоровых эритроцитов. Другие лабораторные данные при HE сходны с таковыми при других гемолитических анемиях и являются неспецифическими маркерами заболевания.

Лечение редко требуется при HE [262]. При необходимости проводят периодическое переливание эритроцитарной массы. Подобно HS, в тяжелых случаях HE и HPP спленэктомия облегчает симптомы заболевания. В большинстве случаев с тяжелым гемолизом и хронической потребностью в переливании крови проводится спленэктомия [248], но в редких случаях наблюдается стойкий тяжелый гемолиз даже после спленэктомии, особенно если имеется сопутствующий HS, снижающий белковую экспрессию [248].

Овалоцитоз Юго-Восточной Азии (SAO). SAO представляет собой аутосомно-доминантную наследственную гемолитическую анемию, вызванную мутацией в гене белка полосы 3 (SLC4A1), приводящей к аномальному фолдингу белка (неправильному сворачиванию его в третичную структуру) [248]. SAO придает устойчивость к церебральной малярии и распространен в Тихоокеанском регионе Юго-Восточной Азии (Индонезия, Филиппины, Меланезии и Южный Таиланд), где его распространенность колеблется от 5% до 25% [267]. В мазке периферической крови обнаруживают округлые эллиптоциты или овалоциты и характерные стоматоциты с продольными прорезями. Также было показано, что из SAO-эритроцитов происходит отток катионов на холоде. Такие эритроциты жесткие и гиперстабильные. У гетерозигот заболевание протекает бессимптомно, несмотря на большие овальные жесткие эритроциты [268]. Гомозиготность приводит к смерти внутриутробно. Описан только 1 гомозиготный пациент с водянкой плода на 22-й неделе беременности, спасенный с помощью внутриутробных трансфузий и родившийся с трансфузионнозависимой, гемолитической и дизэритропоэтической анемией и ацидозом дистальных почечных канальцев [269].

Нарушения проницаемости мембраны эритроцитов или стоматоцитозы

Неспособность регулировать катионный гомеостаз ставит под угрозу способность эритроцитов поддерживать свой нормальный объем, что, в свою очередь, снижает клеточную деформируемость и тем самым нарушает оптимальную доставку кислорода тканям. Увеличение содержания катионов с сопутствующим увеличением содержания воды в клетках и, следовательно, увеличение объема клеток снижает деформируемость эритроцитов, т. к. при этом снижается отношение площади их поверхности к объему. С другой стороны, снижение содержания катионов с сопутствующей потерей клеточной воды и уменьшением клеточного объема снижает деформируемость клеток за счет увеличения концентрации клеточного гемоглобина и, следовательно, увеличения вязкости внутри эритроцита. Нормальное содержание катионов и воды в эритроцитах, определяющее объем эритроцитов, регулируется большим

количеством транспортеров и каналов. Изменения в этих путях и в проницаемости мембран обнаруживаются путем измерения внутриклеточного содержания натрия, калия и общего содержания катионов, а также измененных показателей гидратации эритроцитов [257]. Когда диффузия натрия внутрь превышает диффузию калия наружу, эритроциты набухают. Если диффузия калия наружу превышает диффузию натрия внутрь, эритроциты сморщиваются.

Наследственные стоматоцитозы представляют собой широкий класс гемолитических анемий, характеризующихся изменениями ионного потока в эритроците с повышенной катионной проницаемостью, что приводит к сморщиванию или набуханию эритроцитов [270]. Стомацитозы включают гипергидратированный наследственный стоматоцитоз, дегидратированный наследственный стоматоцитоз, наследственный криогидроцитоз и семейную псевдогиперкалиемию. Они характеризуются наличием разного количества стоматоцитов – эритроцитов с ротообразным бледным участком в центре клетки в мазке периферической крови. Стоит отметить, что стоматоциты также наблюдаются при некоторых других наследственных и приобретенных заболеваниях эритроцитов и мало или вообще не наблюдаются при некоторых нарушениях гидратации [257].

Дегидратированный наследственный стоматоцитоз или ксероцитоз. Ксероцитоз представляет собой клинически гетерогенное аутосомно-доминатное заболевание, обусловленное в 90% случаев мутациями в гене FAM38A, кодирующем механочувствительный неселективный катионный канал PIEZO1 [271], или, реже, мутациями в C^{2+}-активируемом K^+-канале KCNN4 (канал Гардоса) [272, 273]. Наследственный ксероцитоз (НХ) характеризуется аномальной утечкой ионов K^+ из эритроцитов, не компенсируемой пропорциональным увеличением внутриклеточного содержания ионов Na^+, что приводит к клеточной дегидратации. Пациенты с НХ обычно имеют легкую или умеренную гемолитическую анемию или полностью компенсированный гемолиз. Пациенты с НХ проявляют тенденцию к перегрузке железом, независимо от режима переливания крови или спленэктомии. Распространенность, основанная на оценке зарегистрированных случаев, составляет около 1 случая на 50 000 рождений. Однако недавнее исследование [274], проведенное с использованием большой базы данных коммерческих лабораторий США, оценило заболеваемость примерно в 1 случай на 8000 взрослых.

Канал PIEZO1 представляет собой белок с трансмембранными спиралями. Тримеры PIEZO1 образуют 3-лопастную пропеллерную структуру с изогнутой трансмембранной областью, образующей перевернутый мембранный купол, и центральной ионной порой, образованной С-концевыми доменами субъединиц, в которых локализованы большинство мутаций, вызывающих заболевание [275]. В норме, в узких капиллярах и синусоидах селезенки механическое напряжение приводит к расширению канала PIEZO1, что провоцирует открытие поры для ионов, в том числе для Ca^{2+}. Увеличение внутриклеточного Ca^{2+} приводит к активации канала Гардоса, в результате чего происходит отток ионов K^+ с последующей потерей воды, что приводит к временному уменьшению объема клетки и облегчает прохождение эритроцита по узким капиллярам [276]. Такие деформации обратимы, и PIEZO1 в нормальном физиологическом состоянии быстро возвращается к исходной конформации [277]. Большинство

мутаций PIEZO1, вызывающих НХ, связаны с более медленной скоростью инактивации этого канала (мутация с усилением функции) [276], но также существуют другие мутации PIEZO1, характеризующиеся измененной кинетикой канала, реакцией на осмотический стресс и т. д. Недавние исследования продемонстрировали дополнительную роль PIEZO1 во время раннего эритропоэза и созревания ретикулоцитов, а также его роли в других тканях и клетках, таких как лимфатические сосуды, гепатоциты, макрофаги и тромбоциты, которые могут влиять на патофизиологию заболевания [271].

У большинства пациентов с мутацией в белке PIEZO1, несмотря на признаки дегидратации эритроцитов, наблюдается полностью компенсированный гемолиз с высоким количеством ретикулоцитов и нормальным уровнем гемоглобина [271]. Сообщалось даже о нескольких случаях полицитемии (гемоглобин >16 г/дл), несмотря на гемолиз [278]. Пациенты с НХ из-за мутаций в белке PIEZO1 обычно демонстрируют повышенные индексы MCHC, MCH и MCV [279]. У них часто встречается спленомегалия. Исследование 8 пациентов с НХ с мутацией в PIEZO1 показало сниженные уровни всех промежуточных метаболитов пути гликолиза [156]. Это может отражать более высокую потребность в АТР для компенсации оттока K^+ за счет увеличения активности АТР-зависимого насоса Na^+/K^+, а также PIEZO1-индуцированного оттока АТР. Увеличение скорости гликолиза может происходить за счет шунта 2,3-DPG, о чем свидетельствует снижение соотношения 2,3-DPG/Hb у этих пациентов. Возникающее в результате повышенное сродство гемоглобина к кислороду, иллюстрируемое более низким P50, имитирует относительную тканевую гипоксию и впоследствии стимулирует эритропоэз [267]. Осмотическая хрупкость часто, но не всегда, снижена, что ограничивает ее ценность в качестве диагностического теста в этих случаях. Осмотическая градиентная эктацитометрия обычно показывает сдвиг кривой влево, что указывает на дегидратацию эритроцитов и ухудшение их деформируемости (см. ниже). Определение внутриклеточных катионов в эритроцитах показывает пониженное содержание K^+ без соответствующего увеличения содержания Na^+ [280].

Канал KCNN4 имеет 6 трансмембранных спиралей и образует тетрамер в мембране эритроцитов [281]. Мутации KCNN4 влияют на кинетику канала, демонстрируя повышенную величину потока, подобно мутациям PIEZO1 с усилением функции. Однако клеточная патология может быть более сложной с компенсаторными эффектами в случае мутаций KCNN4 p.R352H [272] и p.V282M [282].

У больных с KCNN4-ассоциированным НХ наблюдается более выраженная анемия с более низким количеством ретикулоцитов. Кривая эктацитометрии не всегда демонстрирует нарушения, связанные с KCNN4-НХ. Так, она резко смещена влево со сниженными значениями индекса максимальной деформируемости (EI_{max}) при НХ в результате мутации p.V282M [282], но практически нормальна, без явных признаков клеточной дегидратации при мутации p.R352H, вероятно из-за компенсаторных эффектов [272].

Пациенты с НХ плохо диагностируются, и без генетической оценки диагноз может быть спутан с HS или с врожденной дизэритропоэтической анемией (т. е. анемией, вызванной нарушениями в эритропоэзе с многочисленными нарушениями в эритробластах). Диспластические и двуядерные эритробласты могут

наблюдаться при стрессовом эритропоэзе, связанном с острой гемолитической анемией, также как и при аномальной активации PIEZO1 в эритропоэзе [270]. В мазках периферической крови у пациентов с ксероцитозом обнаруживаются редкие стоматоциты и мишеневидные эритроциты, которые имеют форму мишени с окрашенной периферией и центральным скоплением гемоглобина, но большинство пациентов имеют почти нормальную морфологию эритроцитов. Секвенирование генов с использованием соответствующих генетических панелей имеет важное значение для постановки точного диагноза.

Спленэктомия строго противопоказана при PIEZO1-ассоциированном НХ. Она не имеет терапевтической пользы в виде уменьшения гемолиза, который при НХ в основном внутрисосудистый, и приводит к значительному увеличению риска серьезных венозных и артериальных тромбоэмболических осложнений [283], которые, как было показано, происходят в течение от 1 месяца до 28 лет после спленэктомии [278]. Интересно, что тромботических осложнений после спленэктомии не наблюдалось в общей сложности у 12 пациентов с диагнозом KCNN4 –НХ в период наблюдения от 2 до 44 лет, однако у них продолжался значительный гемолиз даже после спленэктомии [272, 278]. Поскольку было показано, что KCNN4 является основным медиатором дегидратации эритроцитов при НХ из-за мутации PIEZO1 [284], специфический ингибитор KCNN4, сеникапок, был предложен в качестве кандидата для лечения НХ, обусловленного мутациями PIEZO1 или KCNN4. В фазе 3 клинических испытаний по применению сеникапока при серповидно-клеточной анемии было показано уменьшение дегидратации и гемолиза эритроцитов, а также хорошая переносимость препарата [285].

Гипергидратированный наследственный стоматоцитоз. Синдромы гипергидратации эритроцитов характеризуются увеличением внутриклеточного содержания ионов Na^+ и воды в эритроцитах, не компенсируемым снижением внутриклеточного K^+, что приводит к увеличению объема эритроцитов без соответствующего увеличения площади поверхности мембраны [286]. Проницаемость мембраны для ионов натрия при этом увеличена от 10 до 40 раз относительно нормы.

Гипергидратированный наследственный стоматоцитоз (OHSt), вызванный гетерозиготными миссенс-мутациями в гене RHAG, является редким аутосомно-доминантным заболеванием. RHAG кодирует резус-ассоциированный гликопротеин (RhAG), который функционирует как переносчик аммония [287] и является компонентом макромолекулярного комплекса с анкирином, включающего тетрамер белка полосы 3. По результатам молекулярного моделирования мутантного RhAG предполагается, что мутации, приводящие к OHSt способствуют значительному расширению центрального транспортного канала, превращая его в неселективную катионную пору [286].

OHSt является очень редким подтипом среди стомацитозов. По всему миру зарегистрировано около 20 случаев заболевания [270]. OHSt связан с более тяжелыми фенотипами по сравнению с ксероцитозами [288]. Гемолитическая анемия варьирует от умеренной до тяжелой. Было обнаружено, что при данной мутации в мембранах эритроцитов пациентов снижен или отсутствует интегральный мембранный белок стоматин [247], причем мутации гена стоматина не обнаруживаются у больных стоматоцитозом с дефицитом этого белка.

В эритроцитах человека стоматин действует как молекулярный переключатель, который частично превращает транспортер глюкозы 1 (GLUT1) в транспортер L-дегидроаскорбиновой кислоты (DHA), которая метаболизируется с образованием аскорбата [289]. В отсутствие стоматина транспорт DHA с помощью GLUT1 снижается в 2 раза, в то время как поглощение глюкозы значительно увеличивается, что усиливает гликолиз в эритроцитах с OHSt. Исследование метаболома эритроцитов у 4 пациентов с этим заболеванием выявило накопление ADP, пирувата, лактата и малата, а также снижение количества окисленного глутатиона, креатина и эрготионеина.

Анемия характеризуется макроцитозом (MCV находится в диапазоне от 95 до 150 фл), низким значением MCHC (от 24 до 30 г/дл), нормальной осмотической хрупкостью эритроцитов и сдвигом вправо осмолярной кривой при эктацитометрическом анализе, который говорит об увеличении деформируемости таких эритроцитов [257]. В мазке крови наблюдаются стоматоциты (>20%) и сфероциты.

Более легкие формы OHSt связаны с мутацией гена белка полосы 3 - SLC4A1 [257]. Гетерозиготные миссенс-мутации в SLC4A1, расположенные в трансмембранном сегменте белка полосы 3, опосредуют небольшой отток катионов при физиологической температуре, который усиливается при снижении температуры до 5°C. Заболевание носит название криогидроцитоз [257]. В некоторых случаях наблюдаемая утечка катионов может быть опосредована регуляцией других переносчиков белком полосы 3. Подобные мутации SLC4A1 обычно приводят к более легкой форме OHSt, чем мутации RhAG [288]. В мазке периферической крови наблюдаются сфероциты и стоматоциты. Вызванная холодом утечка катионов в эритроцитах пациентов с юго-восточным азиатским овалоцитозом неотличима от таковой при криогидроцитозе.

Другая редкая форма криогидроцитоза связана с мутациями в гене SLC2A1, кодирующем GLUT1, переносчик глюкозы, который также связывает стоматин [257]. У таких пациентов наблюдается дефицит GLUT1 и стоматина, а также большой отток катионов из эритроцитов, который в 10 раз превышает норму при 37°C и увеличивается на холоде. На сегодняшний день сообщалось о 4 пациентах с подобным нарушением [290]. В дополнение к умеренной гемолитической анемии у больных с этими мутациями наблюдаются катаракта из-за измененной катионной проницаемости и неврологические расстройства (судороги, умственная отсталость, дискинезии), связанные с неадекватным транспортом глюкозы в нейроны.

Другие нарушения в белке полосы 3, которые приводят к некоторой степени гипергидратации эритроцитов, включают мутацию de novo этого белка (p. G796R-band3 CEINGE) [291]. Данная мутация представляет собой редкий, преимущественно наследуемый тип нарушений, связанный с легкой гемолитической анемией с циркулирующими стоматоцитами в сочетании с признаками дизэритропоэза. В эритроцитах наблюдается повышенное содержание ионов Na^+, пониженное содержание ионов K^+ и аномальная активность транспорта катионов через мембрану. Кроме того, наблюдается повышенное фосфорилирование тирозина некоторых белков мембраны, что указывает на нарушение фосфо-сигнальных путей, участвующих в событиях регуляции клеточного объема. Мутация CEINGE белка полосы 3 изменяет функцию анионного

обмена этого белка на транспорт катионов и влияет на профиль мембранного фосфорилирования тирозина, в частности белка полосы 3 и стоматина.

Синдром дефицита резус-антигенов (Rh). Резус-антигены являются частью анкиринового мультибелкового комплекса мембраны эритроцитов, который также включает Rh-ассоциированные гликопротеины (RhAG), гликопротеин Ландштейнера-Винера (LW), гликофорин B (GPB), белок 4.2, CD47 и др. Комплекс Rh-RhAG взаимодействует с анкирином, связывая скелет мембраны с липидным бислоем [261], [292]. Синдром резус-дефицита возникает в результате отсутствия (Rh_{null}) или резкого снижения (Rh_{mod}) антигенов группы крови (Rh) на мембране эритроцитов. Это крайне редкое явление, распространенность которого составляет 1 на 6 000 000 случаев [292]. Существует два типа дефицита: регуляторный тип, молекулярной основой которого является мутация в обоих аллелях гена RHAG, приводящая к отсутствию гликопротеина RhAG и тесно связанных с ним белков-партнеров в мембране эритроцитов, и аморфный тип, возникающий в результате мутаций в обоих аллелях гена RHCE в случае отсутствия RhD на поверхности эритроцитов. Для эритроцитов с подобными мутациями характерно отсутствие на мембране антигенов Rh, LW, Fy5 и белков Rh, LW, GPB, RhAG, CD47, а также сниженная экспрессия антигенов Ss, U и Duclos [293]. Эритроциты с Rh_{null} отличаются от эритроцитов больных наследственным стоматоцитозом нормальным содержанием белка 7.2b (стоматина). Клетки Rh_{null} имеют повышенную скорость пассивного и активного транспорта катионов (калия и натрия) и активность Na^+/K^+-АТРазы, что приводит к дегидратации эритроцитов. Они также имеют уменьшенную площадь поверхности эритроцитов и, соответственно, повышенную осмотическую хрупкость. Кроме того, Rh_{null} клетки демонстрируют измененную асимметрию фосфолипидного трансбислоя. Одним их механизмов внесосудистого гемолиза подобных эритроцитов может быть отсутствие на мембране эритроцита CD47, белка, который обеспечивает ингибирующий сигнал для макрофагов селезенки, что предотвращает фагоцитоз [293]. Эритроциты этих пациентов демонстрируют снижение экспрессии CD47 примерно на 90%.

Для Rh-дефицитов характерно наличие хронической гемолитической анемии различной степени тяжести. Осмотическая хрупкость эритроцитов заметно увеличивается после 24 часов инкубации при 37°C, однако может быть в норме без инкубации. Морфология эритроцитов отличается наличием стоматоцитов и сфероцитов, что создает сходство между резус-дефицитом и наследственным сфероцитозом [294]. Спленэктомия может применяться в качестве терапии, которая способствует улучшению состояния, однако может сохраняться остаточный гемолиз [295].

Таким образом, описанные выше нарушения мембран эритроцитов часто диагностируются без каких-либо специализированных лабораторных исследований, кроме тщательного цитологического микроскопического исследования и измерения индексов эритроцитов и ретикулоцитов. Пациенты с семейным анамнезом HS и типичными биологическими проявлениями HS (гемолитическая анемия с высокой концентрацией клеточного гемоглобина (MCHC) >36 г/дл, высокий процент (>4%) гиперденсивных клеток с очень высокой плотностью (MCHC >41 г/дл) и наличием сфероцитарных клеток в мазках крови)

не требуют дополнительного исследования. Тем не менее могут потребоваться более специфические тесты в случаях, когда диагноз HS не очевиден, включая тяжелые формы эллиптоцитоза и стоматоцитоза, при которых диагностика может быть затруднена, особенно при обезвоженной форме. Крайне важно точно диагностировать наследственный стоматоцитоз, чтобы исключить спленэктомию как часть лечения пациента, поскольку спленэктомия при стоматоцитозе приводит к летальному тромбозу. Измерение средней флуоресценции эритроцитов с помощью проточной цитометрии после мечения эритроцитов красителем эозин-5'-малеимидом (EMA) часто используется для документирования потери площади поверхности и является тестом выбора для скрининга HS, при котором диагностика может быть затруднена, в частности в обезвоженной форме. Однако этот тест на основе EMA не выявляет некоторые случаи HS, связанные с дефектами анкирина, и не столь надежен для других нарушений мембран эритроцитов, таких как эллиптоцитоз, пиропойкилоцитоз, стоматоцитоз и овалоцитоз. Осмотическая градиентная эктацитометрия заполняет этот пробел и поэтому считается эталонным методом для дигностики HS и других нарушений мембран эритроцитов. Однако до сих пор использование эктацитометрии не получило широкого распространения в обычных гематологических лабораториях из-за ограниченной доступности эктацитометра. Результаты этого теста позволяют проанализировать три ключевые характеристики профиля кривой осмотической градиентной эктацитометрии (O_{min}, DI_{max} (или EI_{max}) и O_{hyper}). O_{min} – это критическая осмоляльность, при которой клетки достигают сферической формы из-за входа воды в эритроцит в гипоосмотической среде. При дальнейшем уменьшении осмоляльности среды будет происходить гемолиз эритроцитов. Таким образом, Omin чувствительна в величине отношения площади поверхности эритроцита к его объему. DI_{max} (или EI_{max}) – это максимальный индекс деформируемости, который определяется в точке, когда достигается максимальная степень вытянутости (элонгации) эритроцита (по формуле: EI_{max}=(L-W)/(L+W), где L – длина диффракционного сигнала от клетки на лазерной диффракционной картине, а W – ширина лазерного диффракционного сигнала). Этот индекс чувствителен к целостности и эластичности клеточной мембраны. O_{hyper} – это осмоляльность, при которой деформируемость составляет половину между деформируемостью при O_{min} и деформируемостью при достижении EI_{max}. Этот показатель чувствителен к гидратации или дегидратации клетки. Было показано [296], что сфероцитоз, ксероцитоз, овалоцитоз и эллиптоцитоз имеют характерные виды кривых, однако тем не менее имеют место ложноположительные и ложноотрицательные результаты, которые связаны с другими заболеваниями. Окончательный диагноз должен учитывать результаты ЭМА-теста, эктацитометрического и морфологического анализа, анализов, специально предназначенных для дифференциации наследственных мембранопатий от других заболеваний (анализ дефектов ферментов, электрофорез гемоглобина), а также семейного анамнеза пациента. Сводная информация по наследственным мембранопатиям и их особенностям приведена в таблице 8.

Таблица 8. Наследственные мембранопатии и их особенности

Название заболевания	Распространенность	Дефицитный белок	Особенности морфологии	Другие особенности	Терапия
Структурные изменения мембраны					
Наследственный сфероцитоз	1:1000 -1:2500	α-Спектрин	Микросфероциты, сморщенные эритроциты, пойкилоциты	Осмотическая резистентность не чувствительна к этому заболеванию; сниженное связывание эозин-5'-малеимида в тесте EMA; МСНС >36 г/дл; снижение всех параметров в тесте эктацитометрии	Поддерживающая терапия, включающая трансфузии эритроцитарной массы при необходимости и хелаторную терапию. Спленэктомия показана больным с анемией средней и тяжелой степени, требующим частых трансфузий
		β-Спектрин	Акантоциты, сфероциты с шипами		
		Спектрин+анкирин			
		Анкирин	Выраженный сфероцитоз		
		Белок 4.2	Овалоциты, несколько овалостоматоцитов		
		Белок полосы 3	Редкие грибовидные эритроциты		
Эллиптоцитоз (HE)	1:2000 – 1:4000;	α-Спектрин (примерно 65% всех случаев), β-спектрин (30% случаев), белок 4.1R (5%), гликофорин С	Сигарообразные эллиптоциты	Снижение механической стабильности мембраны, фрагментированные эритроциты с уменьшенной площадью поверхности мембраны; часто трапециевидная форма эктацитометрической кривой со снижением DImax	Как правило, не требуется, в редких тяжелых случаях – трансфузии эритроцитарной массы и спленэктомия
Пиропойкилоциоз (HPP)	В некоторых частях Африки 1:100	Мутация в аллеле α-спектрина (α^{LELY}) в тандеме с мутациями, вызывающими эллиптоцитоз	Схожа с морфологией у пациентов после термического ожога; анизоцитоз, пойкилоцитоз, микроциты, фрагментированные клетки, эллиптоциты	Сильно снижена осмотическая резистентность при тяжелых формах; повышенная термическая чувствительность эритроцитов	Младенцы с формой HPP α^{LELY} могут иметь умеренную или тяжелую гемолитическую анемию, требующую частых переливаний крови в раннем возрасте, но фенотип улучшается после первых 1-2 лет и развивается в типичный эллиптоцитоз

Овалоцитоз Юго-Восточной Азии	Распространен в Тихоокеанском регионе Юго-Восточной Азии, где его распространенность колеблется от 5% до 25%	Делеция в SLC4A1 27 пар оснований (белок полосы 3)	Эллиптоциты, овалоциты, стоматоциты	Отток катионов из эритроцитов на холоде; жесткие и гиперстабильные эритроциты	Не требуется для гетерозигот, гомозиготность приводит к смерти внутриутробно
Нарушения проницаемости мембраны эритроцитов или стоматоцитозы					
Дегидратированный стоматоцитоз (ксероцитоз)	1 Случай на 50 000 (по другим оценкам 1:8000 взрослых)	PIEZO1 (90% случаев ксероцитозов)	Редкие стоматоциты и клетки в форме мишени, почти нормальная морфология	Сдвиг кривой осмотической градиентной эктацитометрии влево, говорящий о снижении деформируемости клеток; тенденция к перегрузке железом, независимо от режима переливания крови или спленэктомии; повышенные индексы MCHC, MCH и MCV; снижение соотношения 2,3-DPG/Hb	Спленэктомия строго противопоказана; препарат сеникапок (ингибитор канала KCNN4) на стадии исследований
		KCNN4		Кривая осмотической градиентной эктацитометрии резко смещена влево (деформируемость эритроцитов уменьшена) при мутации p.V282M, но практически нормальна при мутации p.R352H	Спленэктомия не решает проблему гемолиза, сеникапок (ингибитор канала KCNN4) на стадии исследований
Гипергидратированный стомато-цитоз	Около 20 зарегистрированных случаев в мире	резус-ассоциированный гликопротеин (RhAG)	Макроцитоз, >20% стоматоциты	Отсутствует интегральный мембранный белок стоматин; высокие значения MCV (95-150 фл), низкие значения MCHC (24-30 г/дл); увеличение объема эритроцитов без соответствующего увеличения площади поверхности мембраны; сдвиг вправо осмолярной кривой при эктацитометрическом анализе (деформируемость клеток увеличена); повышенное содержание ионов Na^+ и пониженное содержание ионов K^+ в эритроцитах	Спленэктомия частично эффективна для уменьшения гемолиза, но сопряжена с высоким риском тромбоэмболических осложнений
		Белок полосы 3 Ceinge (*SLC4A1 p.Gly796Arg)*	Стоматоциты в сочетании с признаками дизэритропоэза		

Продолжение таблицы 8

Криогидроцитоз		Белок полосы 3	Сфероциты, стоматоциты	Минимальный отток катионов при физиологической температуре, который усиливается при снижении температуры до 5°C	Спленэктомия частично эффективна для уменьшения гемолиза, но сопряжена с высоким риском тромбоэмболических осложнений
	4 зарегистрированных пациента	GLUT1		В дополнение к умеренной гемолитической анемии у больных с этими мутациями наблюдается катаракта из-за измененной катионной проницаемости, а также неврологические расстройства	
Синдром дефицита резус-антигенов (Rh)	Встречаемость 1 на 6 000 000 случаев	Отсутствие антигенов Rh, LW, Fy5 и белков Rh, LW, GPB, RhAG, CD47 на мембране, сниженная экспрессия антигенов Ss, U и Duclos	Сфероциты, стоматоциты	Повышенная скорость пассивного и активного транспорта катионов (калия и натрия) и активность Na^+/K^+-АТРазы, дегидратация эритроцитов, уменьшенная площадь поверхности эритроцитов, повышенная осмотическая хрупкость, измененная асимметрия фосфолипидного трансбислоя	Спленэктомия способствует улучшению состояния, однако может сохраняться остаточный гемолиз

Гемоглобинопатии

Способность эритроцитов переносить кислород обеспечивается наличием в них белка гемоглобина, способного обратимо связывать кислород. Эритроцит заполнен гемоглобином на 98%. Как было сказано выше, молекула этого белка состоит из четырех субъединиц (двух α- и двух β-цепей глобина), каждая из которых содержит в качестве активного центра гем и способна обратимо связывать кислород. Таким образом, одна молекула гемоглобина способна связать от 1 до 4 молекул кислорода [297]. Связывает кислород в гемоглобине находящееся в геме железо [298]. Гем представляет собой комплекс, состоящий из четырех пятичленных гетероциклов, в центре которого координационными связями связывается железо. Эти связи слабые, поэтому железо связывает кислород обратимо. Конформация молекулы гемоглобина влияет на связывание железа с кислородом. В отсутствие кислорода она несколько изменяется (железо немного выходит из плоскости кольца гема, при этом оно хуже связывает кислород). Субъединицы гемоглобина настолько тесно связаны между собой, что могут взаимно влиять на конформации друг друга и, соответственно, на связывание каждой из субъединиц с кислородом. После связывания первой молекулы кислорода с субъединицей гемоглобина конформация субъединицы изменяется, что ослабляет связь четырех субъединиц и облегчает последующее связывание других субъединиц с кислородом. При этом каждая последующая субъединица связывает кислород все более легко. Таким образом, субъединицы гемоглобина работают в связывании с кислородом кооперативно. Такие белки называют аллостерическими. Существование кооперативности обуславливает S-образный характер кривой связывания гемоглобина с кислородом (рисунок 4). Структура гемоглобина, а также различные внутриклеточные факторы, регулирующие сродство кислорода к гемоглобину (концентрации O_2, CO_2, 2,3-DPG и pH) определяют его способность связывать и отдавать кислород таким образом, чтобы это отвечало потребностям организма. Так, в легких растворимого кислорода больше всего, там доминирует связывание кислорода с гемоглобином. По мере того как кровь из легких поступает в другие органы и расходится по разным тканям, концентрация его в крови уменьшается. Равновесие гемоглобина с кислородом сдвигается в сторону отдачи кислорода (влево по кривой диссоциации кислорода от гемоглобина). Кислород освобождается и выходит в кровь (рисунок 4) [244].

Гемоглобин может связываться не только с кислородом, но и с молекулами, похожими на него, такими как оксид углерода CO или цианид ион CN^-[244]. Эти молекулы связываются с гемоглобином сильнее кислорода и очень плохо диссоциируют из образовавшегося комплекса, освобождая гемоглобин. Таким образом, связанный с этими молекулами гемоглобин оказывается недоступен для связывания с кислородом, что нарушает перенос кислорода к тканям и может привести к летальному исходу, если вовремя не предотвратить отравление. Интенсивное дыхание большим количеством кислорода способно вытеснить угарный газ и цианид ион из гемоглобина.

Фенотипы гемоглобина изменяются в процессе развития организма человека [299]. Этот процесс регулируется изменением экспрессии соответствующих генов, кодирующих различные формы глобинов. Так,

гемоглобин F (HbF) – основной фенотип гемоглобина плода в последних двух триместрах беременности имеет немного более высокое сродство к кислороду, чем гемоглобин у взрослого человека, так как слабее связывается с 2,3-DPG, что обеспечивает большее сродство к кислороду и помогает HbF обеспечивать потребность плода в кислороде в условиях его малого общего объема крови. Он более устойчив в щелочной среде, стабилен в более узкой области pH и более подвержен окислению с образованием метгемоглобина. К концу первого года жизни в эритроцитах начинают преобладать «взрослые» гемоглобины: у взрослого человека присутствует примерно 97% гемоглобина A (α2β2), 2–3% HbA_2 (α2δ2) и 1% фетального гемоглобина (α2γ2). Взрослый HbA (α2β2) кодируют гены, расположенные на разных хромосомах. Субъединицы α1 и α2 гемоглобина кодируются генами *HBA1* и *HBA2,* соответственно, которые находятся на хромосоме 16p и близки друг к другу. β-Субъединица гемоглобина кодируется геном *HBB*, который находится на хромосоме 11p. Мутации в этих генах приводят к нарушениям структуры или синтеза цепей гемоглобина.

Примерно 2-7% населения планеты являются носителями наследственных нарушений гемоглобина, обусловленных количественными и/или качественными изменениями молекулы гемоглобина [300, 301]. Нарушения гемоглобина включают талассемию, серповидно-клеточную анемию, гемоглобин E, C, H, D, Пенджаб и другие. Подобные заболевания распространены в бывших малярийных регионах Средиземноморья, Ближнего Востока, Юго-Восточной Азии и Африки. Однако миграция населения и последующее смешение популяций способствовали распространению нарушений гемоглобина во всем мире. Таким образом, распространенность нарушений гемоглобина растет в неэндемичных регионах, таких как Северная и Западная Европа и Северная Америка. β-Талассемия и серповидно-клеточная анемия (SCD), также называемые гемоглобинопатиями β-типа, являются наиболее распространенными и приводят к гемолитической анемии. В США ежегодно рождается от 300 000 до 400 000 детей с SCD или β-талассемией. Из них 83% приходится на SCD и 17% на β-талассемию [301]. Некоторые варианты гемоглобина не оказывают патологического влияния, например α^+-талассемия. Разнообразие менее распространенных вариантов гемоглобина как в α-, так и в β-глобиновых генах может приводить к широкому спектру клинических состояний, таких как эритроцитоз, полицитемия и гемолитическая анемия. Носители мутаций имеют 30-50% вариантного гемоглобина в своих эритроцитах [300]. Существует несколько баз данных о нарушениях гемоглобина – IthaGenes, Ithaphen, HbVar, ClinVar и др. [301-303]. В них хранится систематизированная информация о генах и вариациях, связанных с нарушениями гемоглобина, включая мутации, вызывающие и модифицирующие заболевание, соответствующие нейтральные полиморфизмы, а также данные об этнической принадлежности, частоте мутаций, биохимических и гематологических эффектах и обширные фенотипические описания заболеваний.

Серповидно-клеточная анемия. Серповидно-клеточная анемия (SCA) возникает в случае единичной нуклеотидной замены аденина на тимин в гене β-глобина *HBB* с гомозиготным типом наследования [304]. Такая мутация приводит к тяжелой гемолитической анемии. Гетерозиготный тип

наследования (HbAS) не приводит к гемолитической анемии, однако является фактором риска редких серьезных осложнений, таких как гематурия, гифема (кровь в передней камере глаза), медуллярная карцинома почки, хронические заболевания почек, легочная эмболия, а также риск развития рабдомиолиза и внезапной смерти при интенсивной длительной физической нагрузке. HbAS обеспечивает снижение риска тяжелой малярии на 86%, поэтому распространенность носителей HbAS составляет 10-20% в Африке, Индии, на Ближнем Востоке и в других странах эндемичных малярии [305]. По оценкам ВОЗ на 2008 год около 275 000 человек в мире страдают от серповидно-клеточной анемии [300], около 85% случаев которой приходится на Африку. Распространенность в Северной Америке и Европе составляет 1 на 2000-5000 человек.

В результате нуклеотидной замены аденина на тимин в гене β-глобина происходит замена глутаминовой аминокислоты на валин в гемоглобине. Образующийся при этом серповидно-клеточный гемоглобин (HbS) нейтрален по заряду, менее подвижен на электрофорезе и менее растворим [244]. В капиллярах в условиях частичной дезоксигенации этот белок полимеризуется и выпадает в осадок в форме веретенообразных образований (тактоидов), которые растягивают оболочку эритроцита и приводят к его разрушению (гемолизу) [304]. Это нарушает поток эритроцитов в микроциркуляции, вызывая окклюзию сосудов и, соответственно, ишемию тканей, что проявляется острой болью, дальнейшим развитием патологии органов с возникающими жизнеугрожающими осложнениями, такими как острая секвестрация эритроцитов в селезенке, развивающаяся в результате задержки эритроцитов в селезенке с последующим стремительным снижением Hb и высоким риском развития гипоксического шока, риск смерти от инфекций, ишемический или геморрагический инсульт, острые офтальмологические осложнения, остеонекроз крупных суставов и другие.

Полимеризация HbS зависит от многих факторов, включая концентрацию HbS, парциальное давление кислорода (pO_2), температуру, pH, концентрацию 2,3-DPG и присутствие различных молекул Hb. Повторяющиеся эпизоды полимеризации и деполимеризации HbS в условиях деоксигенации и оксигенации, соответственно, приводят к изменениям структуры мембраны, что провоцирует аномальный катионный гомеостазу в серповидных эритроцитах, везикуляцию мембраны и экспонирование фосфатедилсерина на поверхности эритроцитов [304]. Потеря калия происходит через активируемый кальцием Gardos канал и ко-транспортеры KCC1, KCC3 и/или KCC4 [306]. Это приводит к дегидратации клеток и, соответственно, к увеличению концентрации HbS, что способствует большей полимеризации.

Постоянная экспрессия фетального гемоглобина HbF в диапазоне 10-25% от общего Hb обычно снижает клиническую тяжесть SCA [307]. Однако при неравномерном клеточном распределении HbF не всегда наблюдается мягкий фенотип заболевания. Уровни экспрессии HbF 25-50% в каждом эритроците (общеклеточное распределение) приводят почти к отсутствию анемии с редкими клиническими симптомами [308].

Встречаются случаи комбинированного наследования аномального HbS с другими мутациями β-глобина, при которых сочетаются разные

структурные варианты гемоглобина. Например, генотип HbSC характеризуется двумя разными аллелями, продуцирующими разные варианты гемоглобина: β^S (S-гемоглобин) и β^C (C-гемоглобин). Такой генотип характеризуется более легкой гемолитической анемией с менее частыми острыми и хроническими осложнениями, чем SCA, хотя при нем часто встречаются ретинопатия и остеонекроз [309]. Аллель β^S в сочетании с нулевым аллелем β^0, который приводит к отсутствию трансляции белка, вызывает HbSβ^0-талассемию, клинический синдром, неотличимый от SCA, за исключением наличия микроцитоза [310]. Аллель β^S в сочетании с гипоморфным аллелем *HBB,* кодирующим белок HbSβ^+со сниженным количеством нормального β-глобина, приводит к HbSβ^+-талассемии, клиническому синдрому, обычно более легкому, чем SCA, т. к. обычно у таких пациентов повышен уровень экспрессии нормального HbA. Редко наблюдаемые сложные гетерозиготные генотипы SCD включают HbS в сочетании с HbD, HbE, HbO-Arab или Hb-Lepore [303].

В странах, где распространена SCA, она диагностируется с помощью программ скрининга новорожденных, если таковые имеются. В других случаях заболевание диагностируется по клинической картине, характеризующейся необъяснимыми сильными атравматическими болями, нормоцитарной анемией, признаками гемолиза и другими вышеперечисленными осложнениями. Мутантный гемоглобин обнаруживают с помощью ВЭЖХ, тандемной масс-спектрометрии, капиллярного электрофореза гемоглобина или биохимического теста на серповидность (после 2 лет жизни). ДНК-исследование подтверждает диагноз.

Гидроксимочевина является наиболее часто используемым препаратом для лечения SCA и остается терапией первой линии для большинства людей с SCA [303,304]. Принцип действия гидроксимочевины основан на стимулировании синтеза фетального гемоглобина. Защищающий эффект гемоглобина F наблюдается потому, что смешанный гибрид гемоглобина α2βSγ, который образуется внутри эритроцита в присутствии HbF, не полимеризуется в условиях низкой оксигенации. В зависимости от уровня HbF после введения гидроксимочевины (оптимальным считается уровень примерно 25%) пациент классифицируется как реагирующий или не реагирующий на терапию. Многочисленные генетические исследования охарактеризовали ключевые генетические варианты, в основном в регуляторных путях, которые связаны с индукцией HbF и ответом на терапию [311, 312].

В США и Европе с недавнего времени были одобрены другие препараты для терапии SCA [313]: L-глутамин, кризанлизумаб и вокселотор. Обнадеживающие результаты были получены в клинических испытаниях ингибитора полимеризации HbS вокселотора, который продемонстрировал эффективность (повышение гемоглобина) и безопасность в сравнении с плацебо. Кризанлизумаб, за счет блокады P-селектина, способен уменьшить частоту вазоокклюзивных кризов с 2,98 до 1,63 в год по сравнению с плацебо. Использование L-глютамина при SCA может снизить частоту госпитализаций на 33% и среднюю продолжительность пребывания в стационаре с 11 до 7 дней по сравнению с плацебо. В качестве поддерживающей терапии применяются трансфузии донорской эритроцитарной массы и лечение осложнений SCA.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является единственным способ достичь выздоровления, но она ограничена доступностью подходящих доноров. При этом наилучшие результаты наблюдаются у детей с совместимым родственным донором. Показано, что после родственной HLA-совместимой ТГСК выживаемость без возврата SCA составляет 80-92%, смертность, в основном от хронической «реакции трансплантант против хозяина» (РТПХ), составляет 5-10% [314]. Генная терапия, основанная на аутологичной трансплантации лентивирусно скорректированных гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток, является мнообещающей перспективой для лечения SCA [301]. Для одного пациента с SCA была продемонстрирована эффективность такой терапии [315]. Развивается также технология редактирования генов (модификация, удаление или исправление определенных участков ДНК) в гемопоэтических стволовых клетках. В 2019 году первый пациент с SCA был пролечен с помощью технологии редактирования генов «CRISPR-Cas9 (CTX001)» в рамках исследования фазы 1 в США [301].

Талассемия. Мутации, приводящие к снижению или отсутствию синтеза α- и β-цепей глобинов вызывают α- и β-таласемию, соответственно [303]. Уменьшение или отсутствие цепей α- или β-глобина приводит к избытку неспаренных β- и α-глобинов, соответственно, которые образуют нерастворимые гомотетрамеры, что приводит к их внутриклеточному осаждению в эритроидных предшественниках и, соответственно, к неэффективному эритропоэзу, а также к гемолизу уже созревших эритроцитов, что характеризуется острой гемолитической анемией, характерной для тяжелых форм α-и β-талассемии [316, 317]. Анемия стимулирует выработку эритропоэтина, что приводит к увеличению костного мозга в 25-30 раз по сравнению с нормальным, а в костях возникают аномалии.

Данные нарушения наследуются преимущественно по аутосомно-рецессивному типу. Большинство дефектов α-талассемии (80%) объясняются делециями, затрагивающими гены *HBA1* и *HBA2.* Менее распространены делеции консервативных последовательностей [303]. Остальные 20% дефектов в *генах HBA1* и *HBA2 неделеционные. Возможны также мутации в* регуляторных элементах, контролирующих экспрессию семейств генов α- и β-глобинов (например, в белках ATRX, GATA-1, AHSP). *При данных нарушениях развивается гемолитическая анемия разной степени тяжести.* Возможны сочетания α- и β-талассемии, что относительно выравнивает баланс α- и β-глобиновых цепей, приводя к более мягкому проявлению заболевания [303].

α-Талассемия. У здорового человека за образование α-глобина отвечают четыре α-глобиновых гена, по два на каждой 16р хромосоме (αα/αα). Потеря одного α-глобинового гена (-α/αα) выражается бессимптомной формой α-талассемии [317]. Может наблюдаться микроцитоз и гипохромия при нормальных значениях HbA_2 и HbF. Потеря двух α-глобиновых генов (-α/-α или --/αα) сопровождается легким течением α-талассемии с минимальными проявлениями. Отсутствие функции трех α-глобиновых генов (--/-α) проявляется клинически выраженными изменениями (Hb от 30 г/л до 100 г/л). Эта форма заболевания называется гемоглобинопатия Н (HbH). Отсутствие функции всех четырех α-глобиновых генов (Hb Bart) сопряжено с внутриутробной

гибелью плода или преждевременным рождением ребенка с анемической водянкой плода. В настоящее время при проведении внутриутробных переливаний эритроцитарной массы удается сохранить жизнь таким пациентам.

Заболевание HbH имеет широкий фенотипический спектр [317, 318]. Тяжесть заболевания HbH коррелирует со степенью дефицита α-цепи и варьирует от бессимптомной формы до тяжелой. Гемолиз при болезни HbH может быть вызван окислительным стрессом или инфекцией. Пациенты с биаллельными патогенными мутациями гена *HBA2* могут быть трасфузионно зависимы. Различные генотипы α-талассемии хорошо коррелируют со снижением MCV (микроцитоз), MCH (гипохромия) и концентрацией Hb, а также незначительно повышенным количеством эритроцитов [318]. Концентрация гемоглобина обычно находится в диапазоне 7-10 г/дл, а MCV меняется с возрастом (около 58 фл в детстве и около 64 фл во взрослом возрасте), тогда как MCH составляет около 18 пг независимо от возраста [317]. Похожие признаки, за исключением повышения количества эритроцитов, наблюдаются при железодефицитной анемии, поэтому необходимо исключение железодефицитной анемии путем измерения ферритина. Для выявления аномального гемоглобина используются те же методы, что и для выявления SCA. При подозрении на HbH проводится тест на тельца включения в мазке крови. Для окончательного диагноза α-талассемии необходим молекулярный анализ кластера генов α-глобина. Делеционные типы заболевания HbH с более легкой клинической картиной могут потребовать периодического переливания крови во время интеркуррентного заболевания (случайного заболевания, присоединившегося к основному и осложнившего ход его течения), но в некоторых случаях требуются регулярные переливания. Группа неделеционных типов мутаций HbH требует более регулярных гемотрансфузий, хелатирующей терапии и спленэктомии.

β-*Таласемия*. β-Глобины кодируются β-глобиновым геном, который локализуется на 11p хромосоме (β/β). Для нормального образования молекулы гемоглобина необходима работа двух β-глобиновых генов (β/β). β-Форма талассемии очень гетерогенна. На молекулярном уровне было идентифицировано более 300 мутаций, в основном точечные, в функционально важных областях гена β-глобина [301]. Делеции встречаются редко. Если у человека поврежден только один β-глобиновый ген, то, как правило, заболевание протекает бессимптомно (это малая форма или здоровый носитель) [316]. Малая талассемия в основном проявляется при физиологическом стрессе, беременности или в детском возрасте. Иногда может наблюдаться легкая анемия из-за аномалий морфологии эритроцитов. Уровень гемоглобина может быть >10 г/дл.

Повреждение обоих генов β-глобина приводит к тяжелому течению β-талассемии – это промежуточная и большая β-талассемия (анемия Кули) [316, 319]. Промежуточная талассемия представляет собой гетерогенную генетическую мутацию, при которой продукция β-цепи гемоглобина частично сохранена. Это приводит, как правило, к легкой гемолитической анемии. Уровень Hb колеблется от 7 до 9-10 г/дл. Переливание крови требуется в редких случаях. Увеличение костного мозга с возрастом провоцирует различные осложнения [320]. К атипичным случаям относятся носители β-талассемии

с признаками промежуточной β-талассемии из-за дупликации генов α-глобина [321], пациенты, у которых развивается промежуточная или большая β-талассемия во взрослом возрасте из-за мозаичной частичной однородительской изодисомии (UPiD) (когда человек получает две копии хромосомы только от одного родителя и ни одной от другого) [322], и носители β-талассемии с гаплонедостаточностью *SUPT5H*, демонстрирующей клинические признаки умеренной промежуточной β-талассемии [323].

Большая β-таласемия – это самый тяжелый тип талассемии, которая возникает в случае гомозиготного или сложного гетерозиготного наследования по более тяжелым мутациям в β-цепи [319]. Проявляется в возрасте от 6 месяцев до 2 лет. При большой талассемии у пациентов развивается тяжелая анемия (сердечная недостаточность, усталость кахексия), которая сопровождается многочисленными серьезными осложнениями (гиперкоагуляция, перегрузка железом, инфекции, остеопороз и др.). Уровень Hb может быть <7 г/дл.

Распространенность этого заболевания (с проявлением симптомов) составляет 1 на 10 000 человек в Европейском Союзе и 1 на 100 000 человек во всем мире. Около 1,5% людей в мире являются носителями β-талассемии [316].

Носители талассемии диагностируются по уровню HbA_2 при снижении MCH и MCV. Промежуточная талассемия диагностируется по концентрации гемоглобина от 7 до 10 г/дл, MCV от 50 до 80 фл и MCH от 16 до 24 пг. Большая талассемия характеризуется снижением MCV (от 50 до 70 фл), MCH (от 12 до 20 пг) и уровнем гемоглобина менее 10 г/дл [319,324]. В мазке периферической крови наблюдается микроцитарная гипохромная анемия, ядерные эритроциты. Чтобы идентифицировать варианты Hb и отличить носителя α-талассемии от носителя β-талассемии, проводят капиллярный электрофорез или ВЭЖХ. Количественное определение HbA_2 важно для того, чтобы отличить носителя β-талассемии от α-талассемии. В случае низкого или нормального уровня HbA_2 (2,0–3,1 %) предполагается α-талассемия, повышенный уровень HbA_2 (>3,5 %) указывает на носителя β-талассемии, уровень HbA_2 от 3,1% до 3,5% предполагает α-таласемию или носительство β-талассемии [184]. Молекулярный анализ генов глобина необходим для подтверждения предполагаемого диагноза.

Варианты лечения у пациентов с β-талассемией включают медикаментозное лечение для повышения уровня фетального гемоглобина, железохелатирующую терапию, спленэктомию, антиоксиданты и регулярные переливания крови. Луспатерцепт (активатор эритропоэза) был зарегистрирован в США как вспомогательное средство для улучшения состояния при анемии, особенно у пациентов с тяжелыми формами β-талассемии [301]. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от HLA-совместимого родственника широко признана в качестве стандарта лечения, однако для большинства пациентов такой донор недоступен, а трансплантация от альтернативных доноров сопряжена с риском связанной с лечением смертности в 10% или выше, что считается неприемлемым для незлокачественных нарушений.

Как и в случае в SCA, генная терапия β-талассемии (добавление определенных генов) дает многообещающие результаты. С 2007 года по настоящее

время продолжаются клинические испытания генной терапии β-талассемии с применением различных векторов, экспрессирующих ген глобина (βT87Q) [301, 325, 326]. В совокупности около 100 пациентов были пролечены с использованием генной терапии. Из них, по меньшей мере, половина пациентов ответили на терапию либо полным выздоровлением, либо сильным улучшением. Для всех участников исследования была показана безопасность такой процедуры. В качестве препятствий на пути к регулярному применению генной терапии остаются токсические эффекты миелоаблативной химиотерапии (высокодозная химиотерапия для подавления иммунной системы хозяина), необходимой перед введением пациенту стволовых клеток с генным вектором, сложная логистика и высокая стоимость генной терапии [327]. Стоимость генного препарата «Зинтегло», одобренного в США в 2022 году, составляет 2,8 млн долларов. В настоящее время он является самым дорогим препаратом в мире [328]. Разрабатываемые в настоящее время подходы к редактированию генома при таласемии нацелены не на ген β-глобина, так как обнаружено более 300 разных мутаций этого гена, а на повторную активацию гена γ-глобина и на экспрессию HbF [327].

2.2.2.4. Приобретенные гемолитические анемии

Приобретенные гемолитические анемии можно разделить на две основные группы: (1) иммунные гемолитические анемии, при которых разрушение эритроцитов опосредует выработка антител; (2) неиммунные гемолитические анемии, вызываемые множеством различных причин (описаны ниже).

Иммунные гемолитические анемии

Иммунная гемолитическая анемия связана с нарушениями мембраны эритроцитов, возникающими в результате воздействия (1) аутоантител (собственных антител), направленных против антигенов на поверхности эритроцитов, (2) лекарственных средств, провоцирующих образование неоантигенов на мембране эритроцита или (3) развития аллоантител, продуцируемых организмом против чужеродных антигенов эритроцитов, введенных при переливании крови или при антигенном различии эритроцитов матери и ребенка [329].

Аутоиммунная гемолитическая анемия. Аутоиммунная гемолитическая анемия (AIHA) характеризуется образованием аутоантител, направленных против собственных поверхностных антигенов эритроцитов [330]. Аутоантитела продуцируются как тканевыми, так и циркулирующими аутореактивными В-лимфоцитами после взаимодействия с Т-хелперными лимфоцитами [331]. Следствием может быть гемолиз в результате действия системы комплемента, которая способна индуцировать прямой осмотический лизис эритроцитов, активируя мембраноатакующий комплекс (МАК), или внесосудистый гемолиз в селезенке и лимфоидных органах. Такой гемолиз связан с возникновением антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), в которой участвуют цитотоксичные $CD8^+$ Т-клетки и естественные киллеры (NK), которые взаимодействуют с мембранными рецепторами Fc-фрагмента иммуноглобулина G (IgG), а также с активированными макрофагами, несущими Fc-рецепторы, которые могут распознавать и фагоцитировать

эритроциты, опсонизированные аутоантителами и комплементом. Система комплемента определяет внесосудистый гемолиз или разрушение эритроцитов в печени. Тем не менее чаще происходит внутрисосудистый гемолиз.

Патогенная роль аутоантител зависит от их класса (наиболее часто встречаются IgG и IgM), температуры (теплые и холодовые формы), аффинности и степени активации комплемента, а также от эффективности эритробластного компенсаторного ответа. Взаимодействие всех этих патогенных механизмов обусловливают большую клиническую гетерогенность AIHA, от полностью компенсированных до быстро развивающихся фатальных случаев.

Наличие антител (IgG) или компонентов комплемента (C3d) на поверхности эритроцитов определяют с помощью теста Кумбса (или прямой антиглобулиновый тест (DAT)). На основании класса аутоантител иммуноглобулинов и их тепловых характеристик в прямом антиглобулиновом тесте (DAT) AIHA классифицируются также на холодовые и тепловые формы.

IgG являются наиболее частыми аутоантителами против эритроцитов, которые определяют внесосудистый гемолиз через клеточно-опосредованную цитотоксичность в селезенке и печени. Подкласс IgG влияет на степень выживаемости эритроцитов: IgG1 и IgG3 являются наиболее часто встречающимися подклассами и сильнее опосредуют гемолиз эритроцитов, чем IgG2 и IgG4. Аутоантитела этих классов в основном направлены против эпитопов резус-системы. В тесте Кумбса в реакции антиген-антитело они реагируют при 37 °C и, следовательно, относятся к тепловой форме AIHA, которая составляет 60-70% всех случаев AIHA. IgG (за исключением подклассов IgG2 и IgG4) способны активировать каскад комплемента. Аутоантитела IgA, как правило, связаны с IgG и лишь изредка могут быть единственной причиной AIHA. В тесте DAT при тепловой форме AIHA обнаруживаются только IgG или IgG+C3d.

IgM представляют собой аутоантитела, способные сильнее фиксировать комплемент по сравнению с другими изотипами, вызывая, таким образом, преимущественно внутрисосудистый гемолиз и, в меньшей степени, внесосудистый лизис, опосредованный C3d (в основном в печени). Аутоантитела этого класса направлены против системы антигенов I/i. Их оптимальная температура реакции в тесте Кумбса составляет 4 °C, и поэтому они связаны с холодовой формой AIHA, которая составляют 20-30% всех случаев AIHA [332]. Однако температурная амплитуда аутоантител IgM колеблется от 0 до 34°C [331]. Аутоантитела IgM с температурной активностью, близкой к 37°C, связаны с тяжелыми формами AIHA с зарегистрированным уровнем смертности около 20% [333]. Холодовая форма AIHA делится на болезнь холодовых агглютининов и пароксизмальную холодовую гемоглобинурию. При первой форме в тесте DAT обнаруживаются в большинстве случае только C3. У 20% пациентов в дополнение к C3d могут присутствовать IgG [334]. Вторая форма характеризуется положительным тестом Доната-Ландштейнера и битермическими IgG, направленными против антигена P эритроцитов. Пароксизмальная холодовая гемоглобинурия довольно часто встречается у детей (30% случаев) и довольно редко у взрослых (<1% всех случаев AIHA) [332]. В ретроспективном исследовании пациентов с болезнью холодовых

агглютининов ее молитическая анемия легкой степени наблюдалась у 36% больных (Hb >10,0 г/дл), средней степени (Hb 8,0–10,0 г/дл) у 37% больных и тяжелой степени (Hb <8,0 г/дл) у 37% больных [335]. Тяжесть анемии не коррелировала с уровнями IgM, что может быть связано с комплемент-независимой агглютинирующей активностью эритроцитов.

Все чаще встречаются атипичные случаи AIHA, сочетающие смешанные признаки холодовой и тепловой AIHA (8-10% всех AIHA). В тесте DAT в этих случаях наблюдается сосуществование тепловых аутоантител IgG и холодовых агглютининов IgM с высоким титром. Появляется все больше свидетельств, в основном DAT-отрицательных случаев, которые часто связаны с тяжелым и рефрактерным течением заболевания и могут иметь фатальный исход [336]. DAT-отрицательные случаи могут быть вызваны тепловыми аутоантителами IgM, которые можно идентифицировать с помощью двойного прямого антиглобулинового теста (DDAT) [337].

Аутоиммунные гемолитические анемии могут возникать без очевидной основной причины (первичная аутоиммунная гемолитическая анемия) или могут быть вторичными по отношению к другим состояниям, таким как лимфома, хронический лимфолейкоз, аутоиммунные заболевания, включая системную красную волчанку, ревматоидный артрит и др.

Первичная болезнь холодовых агглютининов определяется хроническим гемолизом, значительным титром холодовых антител (>64) при 4°C, типичными результатами DAT и отсутствием основного клинического заболевания [338]. Однако недавно было показано, что при этом заболевании наблюдается специфическая гистопатологическая картина костного мозга, называемая «первичным лимфопролиферативным заболеванием (LPD), ассоциированным с холодовыми антителами». Было обнаружено, что оно отличается от других ранее известных форм лимфомы [339]. Типичные результаты были описаны как узелковые скопления B-клеток (или, у некоторых пациентов, только рассеянные B-клетки) без характерных признаков других лимфом, таких как паратрабекулярный рост, фиброз, морфология лимфоплазмацитоидных клеток или увеличенное количество тучных клеток, окружающих лимфоидные агрегаты. Мутация MYD88 L265P, присутствующая почти во всех случаях лимфоплазматической лимфомы [340], отсутствует или встречается редко при LPD [339]. Вторичный синдром холодовых агглютининов встречается чаще, чем первичный и может наблюдаться при агрессивной лимфоме, после аллогенной трансплантации стволовых клеток или специфических инфекций (*Mycoplasma pneumoniae*, вирус Эпштейна-Барра, гепатиты B и C, ВИЧ и др.).

Приблизительно 50% тепловых форм аутоиммунной гемолитической анемии (wAIHA), наблюдаемых во взрослом возрасте, связаны с наличием основного другого заболевания, определяющего вторичные wAIHA [338]. Можно выделить три группы заболеваний, которые преимущественно связаны с wAIHA у взрослых: (1) лимфопролиферативные заболевания (преимущественно B-клеточные лимфомы); (2) аутоиммунные заболевания и особенно системная красная волчанка; (3) первичные иммунодефициты (в основном общий вариабельный иммунодефицит). Кроме того, wAIHA может возникнуть в результате инфекции (ВИЧ, вирус Эбштейна-Барра,

гепатит С, цитомегаловирус, туберкулез, бруцеллез, бабезиоз) или проведенных трансплантаций (костного мозга, печени, тонкой кишки).

Терапией первой линии тепловой формы AIHA является назначение кортикостероидов. Для пациентов, не отвечающих на терапию, лечение второй линии включает ритуксимаб (противоопухолевый препарат, представляющий собой синтетическое химерное моноклональное антитело (мышь/человек) специфичное с CD 20 на поверхности лимфоцитов B) или спленэктомию. Комбинация других иммунодепрессантов представляет собой лечение третьей линии для пациентов с резистентным/рецидивирующим заболеванием. В отличие от wAIHA, терапия кортикостероидами и другими неспецифическими иммунодепрессантами обычно неэффективна при холодовой форме AIHA (cAIHA). При этой форме применяется ритуксимаб отдельно или в сочетании с бендамустином (алкилирующим противоопухолевым препаратом) или флударабином (иммуносупрессивным цитостатическим препаратом, антиметаболитом из группы пуринов). Согласно небольшим ретроспективным исследованиям и описаниям клинических случаев, спленэктомия неэффективна в терапии болезни холодовых агглютининов [335]. В критических ситуациях проводят плазмаферез [341]. Несколько новых препаратов, нацеленных на B-клетки/плазматические клетки, комплемент и фагоцитоз, проходят клинические испытания [342-344]. В 2022 году в США для лечения болезни холодовых агглютининов был одобрен сутимлимаб (Энджеймо), моноклональное антитело, подавляющее классический путь комплемента. Помимо вышеперечисленной терапии проводят поддерживающую симптоматическую терапию гемолиза, включающую при необходимости гемотрансфузии [338].

При смешанных AIHA применяется две или более линий терапии, включая кортикостероиды, ритуксимаб, иммунодепрессанты и/или спленэктомию [338].

Лекарственно-индуцированная иммунная гемолитическая анемия. Более 150 лекарственных препаратов могут вызвать развитие тепловой AIHA [345, 346]. В зависимости от механизма связанные с лекарственными средствами wAIHA можно разделить на 2 категории. Первая связана с «лекарственнозависимыми» антителами, которые активируют иммунный ответ только в присутствии лекарства. Это наиболее распространенный тип AIHA из связанных с лекарственными средствами. Существует два подтипа таких антител: (1) гаптен-опосредованные антитела, которые реагируют на смешанный эпитоп, состоящий из эритроцитов нековалентно связанных с препаратом (сильное связывание антител обычно наблюдается при индуцированной пенициллином AIHA), и (2) антитела, слабосвязывающиеся с эритроцитами (например, антибиотик цефтриаксон), что приводит к образованию иммунных комплексов. Первый случай характеризуется положительным тестом DAT для IgG и отрицательным для компонента комплемента. Второй случай слабого связывания препарата характеризуется положительным тестом DAT на компонент комплемента и отрицательным на IgG. Второй механизм связан с независимыми от лекарств антителами, которые способны вызывать аутоиммунный ответ в отсутствие лекарственного средства. Были предложены различные механизмы, с помощью которых препараты (например, цитостатики с иммуносупрессивным действием из группы антипуринов

флударабин или кладрибин, или гипотензивное средство метилдопа) стимулируют образование аутоантител посредством адсорбции, иммунной дисрегуляции или других механизмов, но ни один из них не был полностью доказан. Таким образом, лекарственнозависимые антитела реагируют *in vitro* только в присутствии лекарственного средства, связанного с эритроцитами или добавленного в сыворотку пациента в тест-системах (например, антибиотики пенициллин и цефотетан). Антитела, независимые от лекарств, могут быть обнаружены *in vitro* без добавления какого-либо лекарства. Типичным примером является препарат метилдопа, который вызывает выработку аутоантител к эритроцитам примерно у 15% пациентов, получающих препарат, но только у 1% развивается AIHA [333].

Аллоиммунные гемолитические анемии. Аллоиммунизация, или образование аллоантител к антигенам, присутствующим на поверхности переливаемых эритроцитов, остается серьезной опасностью переливания крови и частым неблагоприятным исходом в условиях беременности [347]. Подсчитано, что антитела групп крови, не относящиеся к группе ABO, обнаруживаются у 8% обычных пациентов, причем более высокие показатели (20-50% пациентов) обнаруживаются среди лиц, которым постоянно переливают кровь, например у пациентов с серповидно-клеточной анемией, талассемией и миелодиспластическим синдромом. У беременных пациенток не связанные с ABO антитела подвергают плод и новорожденных высокому риску потенциально разрушительной гемолитической болезни. Для трансфузионнозависимых пациентов эти антитела усложняют процесс поиска совместимых доноров эритроцитов и повышают риск гемолитических трансфузионных реакций. При переливании эритроцитов В-клетки реципиента распознают антиген на поверхности эритроцитов донора, которого нет у реципиента, вызывая у реципиента иммунный ответ на эти эритроциты, несущие чужеродный антиген. Клинически это проявляется острой гемолитической трансфузионной реакцией. В случае более медленного образования антител может возникнуть отсроченная трансфузионная реакция при последующих переливаниях крови с такими же антигенами. Оба процесса приводят преимущественно к внутрисосудистому гемолизу путем фиксации на поверхности эритроцитов комплемента либо к внесосудистому гемолизу за счет опсонизации. Отсроченная гемолитическая трансфузионная реакция обычно проявляется не так резко, как острая. Диагноз подтверждается положительным прямым антиглобулиновым тестом (DAT) и общими признаками сильного гемолиза (по таким показателям как гаптоглобин, лактатдегидрогеназа, гемоглобинурия, биллирубин). Одним из самых классических примеров этого процесса является аллоиммунизация к антигену D у эритроцитов, который определяет резус-принадлежность крови (RhD). В случае RhD отрицательной матери и RhD положительного плода анти-RhD-антитела матери, выработавшиеся в ее крови либо во время первой беременности, либо в результате небольшого кровоизлияния между матерью и плодом во время беременности, проникают через плаценту и вызывают разрушение эритроцитов плода. Помимо данного антигена были открыты десятки различных белковых и углеводных антигенов (C, E и K, а также $Fy^{a/b}$, $Jk^{a/b}$, S и др), однако лишь небольшая их часть связана с клинически значимыми реакциями. Чаще всего

с аллоиммунизацией ассоциируются антигены D, C, E, K, $Fy^{a/b}$, $Jk^{a/b}$ [348]. Переливание эритроцитов с соответствующими антигенами приводит к частоте аллоиммунизации всего от 1% до 5%, что значительно ниже по сравнению с показателями, наблюдаемыми среди пациентов с серповидно-клеточной анемией, которым переливают эритроциты, не соответствующие этим распространенным антигенам эритроцитов (до 30%). С иммунизацией плода чаще всего связаны анти-D, анти-Kell и анти-C антитела [347]. В развитых странах для предотвращения иммунизации плода антителами RhD проводят плановое введение матери резус-иммуноглобулина (RhIg). Однако не существует инъекций для предотвращения образования других антител, таких как анти-Келл и анти-С.

Неиммунные гемолитические анемии

Среди неиммунных гемолитических анемии существуют возникающие в результате механических повреждений мембраны эритроцитов (по разным причинам), в результате мутаций, провоцирующих комплемент-опосредованный гемолиз, и в результате заражения эритроцитов паразитами.

Микроангиопатическая гемолитическая анемия. Это заболевание возникает в результате механического повреждения мембраны эритроцитов с образованием деформированных фрагментированных эритроцитов (шистоцитов), что приводит к внутрисосудистому гемолизу и может приводить к развитию гемолитической анемии [349].

Можно выделить три типа состояний, оказывающих такое воздействие на эритроциты: (1) наличие внутрисосудистых механических устройств (например, протезы сердечных клапанов, вспомогательные желудочковые устройства или экстракорпоральный мембранный оксигенатор); (2) длительное значительное физическое воздействие на определенную часть тела (например, подошву стопы), так называемая «маршевая гемоглобинурия» у спортсменов [350]; (3) стеноз микрососудов, который может возникнуть в результате следующих типов патологии [349].

1. Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), характеризующаяся тромбозом, высоким уровнем фактора фон Виллебранда, у пациентов с тяжелым дефицитом дезинтегрина и металлопротеазы.

2. Тромботическая микроангиопатия (ТМА), наблюдаемая у пациентов с инфекцией шигатоксин- или нейраминидазо-продуцирующими микроорганизмами или у пациентов с атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС).

3. Богатые фибрином тромбы, например у пациентов с диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, а также у пациентов с различными другими состояниями, такими как катастрофический синдром антифосфолипидных антител, синдром гемолиза, повышенный уровень печеночных ферментов и низкий уровень тромбоцитов при беременности (HELLP), гепарин индуцированная тромбоцитопения, пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

4. Васкулит с инфильтрацией стенки сосуда воспалительными клетками у пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями или некоторыми инфекциями, такими как пятнистая лихорадка Скалистых гор, сибирская язва, тяжелый Clostridium difficile колит.

5. Внутрисосудистые скопления раковых клеток у больных с метастатическим новообразованием.

Тромбоцитопения является общим признаком этих пяти состояний, возникающих в результате потребления (как это часто происходит в п. 1, 2, и 3 и изредка в п. 4 и 5), разрушения (как может произойти в п. 4 из-за аутоиммунитета или гемофагоцитоза) или нарушения продукции тромбоцитов (п. 5, когда есть метастатическое новообразование в костном мозге).

Состояния, вызывающие механическое повреждение эритроцитов, характеризуются высокими напряжениями сдвига [351]. В ответ на напряжение сдвига эритроцит изменяет свою форму, может происходить значительное натяжение его клеточной мембраны. Когда деформация превышает критическое значение, наступает гемолиз. Здоровые эритроциты могут выдерживать высокое напряжение сдвига только в течение короткого времени.

При наличии внутрисосудистых механических устройств, помимо напряжения сдвига, вклад в гемолиз вносит контакт эритроцитов с нативными или искусственными поверхностями сердца, на что влияют особенности контактной площадки и липкость поверхности [352]. Эксперименты *in vitro* показали, что механические протезы аортального клапана создают напряжение сдвига в низком диапазоне [353], что согласуется с легкой степенью гемолиза, обычно наблюдаемой у пациентов с механическим протезом. Однако наличие сопутствующих мембранопатий эритроцитов (например, наследственный эллиптоцитоз и сфероцитоз) может вносить серьезный вклад в тяжесть гемолиза. При наследственном сфероцитозе и эллиптоцитозе эритроциты обладают пониженной деформируемостью и повышенной хрупкостью и поэтому более склонны к механическим повреждениям в результате высокого напряжения сдвига [354, 355]. Сферическая форма кажется более подверженной фрагментации по сравнению с эллиптической формой [354]. Были описаны случаи бессимптомных носителей наследственного эллиптоцитоза и сфероцитоза, у которых развилась анемия после замены нативного клапана механическим [236]. Кроме того, эффективность эритропоэза, скрытые кровопотери (пациенты с протезами клапанов и протезными кольцами часто принимают пероральные антикоагулянты и/или антитромбоцитарные препараты) и сопутствующая почечная недостаточность вносят вклад в тяжесть анемии при механическом гемолизе [351]. Таким образом, клиническая картина может широко варьироваться от бессимптомного хронического внутрисосудистого гемолиза до выраженной застойной сердечной недостаточности, например при дисфункции протеза клапана, связанной с массивным внутрисосудистым гемолизом. Редко происходит немедленное начало гемолиза. Гемолитическая анемия вызывает увеличение сердечного выброса, что, в свою очередь, увеличивает скорость гемолиза, создавая тем самым порочный круг. Субклинический механический гемолиз часто наблюдается у пациентов с современными механическими протезами. Его частота колеблется от 26% до 95% в соответствии с принятыми диагностическими критериями [356, 357]. Диагностируется механический гемолиз на основании наличия классических признаков внутрисосудистого гемолиза, по наличию шистоцитов в мазке периферической крови (>0,5%). Коррекция причины клинически значимого гемолиза (неисправность протеза или болезнь

нативного клапана) является единственным методом лечения, а хирургическое вмешательство остается золотым стандартом терапии. Легкую механическую гемолитическую анемию можно лечить бета-блокаторами, препаратами железа и пентоксифиллином [358].

В случае артериолярного/капиллярного тромбоза и стеноза сосудов патологический исход определяет аномально высокое напряжение сдвига, а взаимодействие эритроцитов с поверхностью играет второстепенную роль [351].

Маршевая гематурия вызывается физическим и механическим внутрисосудистым гемолизом в капиллярах на подошве стопы в результате шаговых упражнений босиком [350]. Она встречается редко и не говорит о каком-либо серьезном нарушении, приводящем к нефропатологии.

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNG) является редким заболеванием, которое клинически проявляется множеством симптомов, наиболее распространенными из которых являются гемолитическая анемия, гемоглобинурия и соматические симптомы. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия возникает вследствие генетической мутации в гемопоэтических стволовых клетках. Приобретенный дефект возникает в соматических или клонированных гемопоэтических стволовых клетках. Мутация гена *PIGA*, сцепленного с Х-хромосомой, приводит к дефициту белка гликозилфосфатидилинозитола (GPI), который отвечает за прикрепление других белковых фрагментов к поверхности эритроцитов [359, 360]. Таким образом предотвращается присоединение белков-ингибиторов (CD55 и CD59) комплемента к поверхности эритроцита, в результате чего возникает хронический комплементопосредованный гемолиз эритроцитов. Кроме того, дефект якорного белка GPI усиливает активацию и агрегацию тромбоцитов в дополнение к гемолизу эритроцитов. Истощение оксида азота и активация комплемента также способствуют тромбозу, усиливая агрегацию тромбоцитов и высвобождение воспалительных цитокинов, соответственно [361]. PNG встречается редко, частота возникновения оценивается как 16 случаев на 1000 000 человек во всем мире. Вероятно, низкая распространенность связана со сложностями диагностики у людей с ограниченной симптоматикой или с сопутствующими заболеваниями, которые скрывают диагноз PNG. Проведенный в 2020 г. анализ данных Международного регистра PNG показал, что средний возраст начала заболевания составляет 35,5 лет [362]. При PNG большинство симптомов, которые обнаруживаются у пациентов, являются следствием внутрисосудистого гемолиза [361]. При лабораторных исследованиях часто обнаруживают анемию, которая приводит к неспецифическим жалобам, таким как утомляемость и одышка. У некоторых пациентов также может наблюдаться неадекватная реакция костного мозга и такие состояния, как апластическая анемия [363]. Около 40% пациентов с PNG во время болезни испытывают тромбозы [361]. Тромбоз является наиболее частой причиной смерти при этом состоянии. Венозная тромбоэмболия встречается чаще, чем артериальный тромбоз. Часто наблюдаются церебральные и интраабдоминальные венозные тромбозы. Наиболее частым местом тромбоза у пациентов с PNG является печеночная вена [364]. Классификация PNG, предложенная Международной группой по исследованию PNG, включает три подтипа [365]: (1) классическая PNG,

включающая гемолитических и тромботических пациентов, у которых имеются признаки PNG при отсутствии другого нарушения функции костного мозга; (2) PNG в присутствии других первичных заболеваний костного мозга, таких как апластическая анемия, первичный миелофиброз или миелодиспластический синдром; (3) субклиническая PNG, при которой пациенты имеют небольшие клоны PNG (т. е. клеток с нарушением структуры мембраны, а именно со сниженной экспрессией или отсутствием на поверхности клеток белковых структур, так называемых якорных протеинов, обеспечивающих защиту собственных клеток от деструктивного воздействия активированного комплемента), но не имеют клинических или лабораторных признаков гемолиза или тромбоза.

Проточная цитометрия с использованием различных моноклональных антител и флуоресцентного аэролизинового реагента (FLAER) считается золотым стандартом диагностики PNG [361]. FLAER способен напрямую связываться с закрепленным на мембране GPI. Этот тест позволяет оценивать различные GPI-заякоренные белки, особенно CD55 и CD59, с высокой чувствительностью и специфичностью [365].

В основе современной терапии PNG лежат препараты для блокирования альтернативных путей комплемента, такие как экулизумаб и равулизумаб, представляющие собой моноклональные антитела, ингибирующие компонент комплемента C5. В 2021 году в США, Европейском Союзе и Австралии для лечения взрослых с PNG был одобрен пегцетакоплан [366]. Это циклический пептид, конъюгированный с полиэтиленгликолем, и первый препарат, связывающийся с компонентом комплемента C3 и его фрагментом C3b, предшествующими C5. Новая стратегия ингибирования проксимальной активности комплемента с помощью пегцетакоплана контролирует C5-опосредованный внутрисосудистый гемолиз и предотвращает C3-опосредованный внесосудистый гемолиз. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток также имеет место в лечении PNG [361].

Гемолитические анемии, обусловленные дефицитом витамина Е. Дефицит витамина Е в рационе распространен в странах с низким уровнем продовольственной обеспеченности. Среди взрослых в других странах дефицит витамина Е встречается редко и обычно связан с нарушением всасывания жиров. Заболевания, вызывающие мальабсорбцию жиров, включают: абеталипопротеинемию (синдром Бассена-Корнцвейга, обусловленный генетическим отсутствием аполипопротеина B), хроническое холестатическое заболевание гепатобилиарной системы, панкреатит, синдром короткой кишки и муковисцидоз. Было показано, что у взрослых с муковисцидозом дефицит витамина Е вызывает легкий гемолиз, не приводя к анемии [367], однако у новорожденных детей с муковисцидозом наблюдается тяжелая гемолитическая анемия, которая купируется при введении витамина Е [368].

Основными симптомами дефицита являются гемолитическая анемия и неврологический дефицит. Диагноз основывается на измерении отношения α-токоферола плазмы к общему количеству липидов плазмы. Низкое соотношение предполагает дефицит витамина Е. Лечение заключается в пероральном приеме витамина Е в высоких дозах.

Гемолитические анемии, обусловленные разрушением эритроцитов паразитами. Прямое разрушение эритроцитов может быть опосредовано самим патогеном или токсином, продуцируемым патогеном. Малярия, бабезия и *Bartonella bacilliformis* (*B. bacilliformis*) [369] непосредственно разрушают эритроциты. *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) вызывает опосредованное токсинами разрушение эритроцитов.

Малярия. Наиболее распространенной причиной паразитарного поражения эритроцитов является малярия. Она возникает в результате заражения паразитическими простейшими, принадлежащими к роду *Plasmodium. Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax* вызывают большинство малярийных инфекций человека. При этом *P. Falciparum* является более вирулентным [370]. Малярия является основной причиной анемии в тропических районах. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2021 году было зарегистрировано около 247 миллионов случаев заболевания малярией и 619 000 случаев смерти [371]. Большинство случаев малярии в мире (96%) приходится на африканские регионы, из них половина случаев на Нигерию, Демократическую республику Конго, Уганду и Мозамбик.

Клинические последствия малярии и, в частности, распространенность анемии зависят от интенсивности ее передачи [372]. Основными факторами, определяющими интенсивность передачи малярии, являются плотность и продолжительность жизни местных комаров-переносчиков. В регионах с высокой степенью передачи малярии люди могут получать до одного инфекционного укуса каждый день, поэтому все население повторно заражается, но основное бремя болезни ложится на маленьких детей, и большинство из них страдают анемией. По мере роста ребенка развивается заболевание, контролирующее иммунитет, так что к подростковому и взрослому возрасту почти все малярийные инфекции протекают бессимптомно. В регионах с более низкой степенью передачи малярии симптоматическая малярия и связанная с ней анемия могут возникать в любом возрасте, хотя дети и беременные женщины более подвержены анемии.

Патогенез малярийной анемии многофакторный [373, 374]. Малярия вызывается внутриэритроцитарным паразитом. На одной из стадий его развития происходит разрыв созревшего малярийного шизонта, который сопровождается разрывом и гибелью эритроцитов с высвобождением в кровь так называемых мерозоитов, способных вновь заражать неповрежденные эритроциты. Однако более важным фактором является ускоренное разрушение эритроцитов, не несущих внутри паразитов, которое соответствует тяжести заболевания Основной причиной этого обычно быстрого снижения гематокрита является гемолиз не несущих паразита эритроцитов [374]. Было показано, что при тяжелой малярии, вызванной *P. Falciparum* или *P. knowlesi*, вся популяция эритроцитов становится менее деформируемой [375, 376]. Механизмы, ответственные за снижение деформируемости неинфицированных эритроцитов, точно не идентифицированы, хотя есть данные об их повышенном окислительном повреждении при острой малярии, которое может нарушить функцию мембраны эритроцитов и снижать деформируемость [376]. При малярии у обезьян сообщалось об инверсии липидного бислоя эритроцитарной мембраны в неинфицированных эритроцитах, но это не изучалось у человека

[377]. При острой малярии селезенка быстро реорганизуется и увеличивается. Это приводит к увеличению способности к клиренсу аномальных эритроцитов с увеличением чувствительности таким образом, что селезенка удаляет большое количество относительно жестких эритроцитов, которые у здорового неинфицированного человека могли бы оставаться в кровотоке [378]. Кроме того, малярийная гемолитическая анемия усугубляется дизэритропоэзом во время и сразу после острого заболевания, что приводит к низкому количеству ретикулоцитов в острой симптоматической фазе заболевания. В работах [259, 260] показано, что дизэритропоэз при малярии связан с интрамедуллярной выработкой медиаторов, которые подавляют эритропоэз (провоспалительные цитокины, оксид азота, липопероксиды, биологически активные альдегиды). Кроме того, дизэритропоэз и анемия связаны с интрамедуллярным отложением малярийного пигмента (гемозоина) [372]. Это обязательный побочный продукт переваривания гемоглобина внутриэритроцитарным малярийным паразитом. Гемозоин выбрасывается в кровоток при разрыве эритроцита на определенной стадии развития паразита и обычно обнаруживается в мазках периферической крови или костного мозга после фагоцитоза нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Было показано, что гемозоин как индуцирует, так и подавляет продукцию провоспалительных цитокинов в различных экспериментальных условиях [379]. Это приводит к сокращению выживаемости эритроцитов. Селезенка также выполняет свою нормативную функцию удаления внутриэритроцитарных частиц. В этом случае селезенка удаляет поврежденных внутриэритроцитарных паразитов (особенно после лечения производным артемизинина) с помощью процесса, называемого «питтингом» [380]. Затем она возвращает «когда-то паразитированные» эритроциты обратно в кровоток, но эти эритроциты с «ямками» имеют сильно сниженную продолжительность жизни [381].

При клинической оценке анемии диагностика острой малярии проводится либо с помощью обнаружения малярийных паразитов в мазке крови, либо с помощью специального экспресс-теста. Микроскопия или экспресс-тест имеют порог обнаружения примерно 50 паразитов/мкл. Тест для малярии P. falciparum обычно идентифицирует богатый гистидином белок P. falciparum HRP2 в качестве антигена-мишени [382]. Методы ПЦР теперь могут обнаруживать плотности паразитов в 1000 раз ниже, чем микроскопия или экспресс-тесты, но из-за высокой фоновой частоты бессимптомной паразитемии [383] они слишком чувствительны для диагностики острых заболеваний.

Быстро пролеченный отдельный эпизод малярии у пациента с преморбидным нормальным гемоглобином, как правило, не приводит к клинически значимой анемии [372]. Основной причиной клинически значимой анемии является кумулятивное воздействие повторяющихся заболеваний рецидивирующей малярией. В районах, эндемичных по P. vivax, часто рецидивирующая малярия является основной причиной малярийной анемии в детском возрасте [384]. В районах, эндемичных по P. falciparum, частые инфекции или неоднократная безуспешная терапия вызывают анемию [372].

Противомалярийным средством выбора при тяжелой малярии является парентеральное введение артесуната (artesunate) [371]. Тяжелая анемия (гемоглобин < 5 г/дл) требует переливания крови. В 2021 году вакцина против

малярии (RTS,S/AS01) была одобрена ВОЗ к широкому использованию у детей в регионах распространения малярии. Эффективность ее составляет от 30% до 55% у детей в возрасте от 0 до 17 месяцев [369].

2.2.4. Анемия хронического заболевания

Анемия хронического заболевания занимает 2-е место после железодефицитной анемии по распространенности в мире [385]. Распространенность в пожилом возрасте варьирует от 2,9 до 61% у мужчин и от 3,3 до 41% у женщин. Это вторичная анемия, возникающая при инфекционно-воспалительных процессах, неинфекционных воспалительных заболеваниях. Выделяют три основных механизма возникновения.

- Незначительное укорочение продолжительности жизни эритроцитов, обусловленное, как считается, усилением гемофагоцитоза макрофагами, возникает у пациентов с воспалительными заболеваниями.
- Эритропоэз нарушается в связи со снижением продукции эритропоэтина (ЭПО) и снижением реакции костного мозга на него.
- Метаболизм железа изменяется в связи с увеличением уровня гепсидина, который ингибирует всасывание и рециркуляцию железа, что приводит к секвестрации железа.

Основным способом коррекции анемии у данной категории пациентов является лечение активного воспалительного процесса.

Список литературы

1. *Obydennyi, S.I., Artemenko, E.O., Sveshnikova, A.N., Ignatova, A.A., Varlamova, T.V, Gambaryan, S., Lomakina, G.Y., Ugarova, N.N., Kireev, I.I., Ataullakhanov, F.I., Novichkova, G.A., Maschan, A.A., Shcherbina, A., Panteleev, M.,* Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott-Aldrich syndrome platelets. *Haematologica* 2020, 105, 1095–1106.

2. *Schaff, M., Tang, C., Maurer, E., Bourdon, C., Receveur, N., Eckly, A., Hechler, B., Arnold, C., de Arcangelis, A., Nieswandt, B., Denis, C. V, Lefebvre, O., Georges-Labouesse, E., Gachet, C., Lanza, F., Mangin, P. H., Integrin* α6β1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 2013, 128, 541–552.

3. *Janus-Bell, E., Yakusheva, A., Scandola, C., Receveur, N., Ahmed, U. M., Mouriaux, C., Bourdon, C., Loubière, C., Eckly, A., Senis, Y. A., Panteleev, M. A., Gachet, C., Mangin, P. H.,* Characterization of the role of integrin α5β1 in platelet function, hemostasis, and experimental thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2022, 122, 767–776.

4. *Topalov, N.N., Yakimenko, A.O., Canault, M., Artemenko, E.O., Zakharova, N.V, Abaeva, A.A., Loosveld, M., Ataullakhanov, F. I., Nurden, A.T., Alessi, M.-C., Panteleev, M.A.,* Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin α(IIb)β(3). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012, 32, 2475–2483.

5. *Panteleev, M.A., Andreeva, A.A., Lobanov, A.I.,* Differential drug target selection in blood coagulation: what can we get from computational systems biology models? *Curr. Pharm. Des.* 2020, 26, 2109–2115.

6. *Nechipurenko, D.Y., Mangin, P.H., Panteleev, M.A.,* Response by Nechipurenko et al to letter regarding article, «Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface». *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019, 39, e290–e291.

7. *Panteleev, M.A., Balandina, A.N., Lipets, E.N., Ovanesov, M.V, Ataullakhanov, F.I.,* Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation. *Biophys. J.* 2010, 98, 1751–1761.

8. *Panteleev, M.A., Ovanesov, M.V, Kireev, D.A., Shibeko, A.M., Sinauridze, E.I., Ananyeva, N.M., Butylin, A. A., Saenko, E. L., Ataullakhanov, F. I.,* Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively. *Biophys. J.* 2006, 90, 1489–1500.

9. *Dashkevich, N.M., Ovanesov, M.V, Balandina, A.N., Karamzin, S.S., Shestakov, P.I., Soshitova, N.P., Tokarev, A. A., Panteleev, M. A., Ataullakhanov, F. I.,* Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave. *Biophys. J.* 2012, 103, 2233–2240.

10. *Nagashima, M., Yin, Z.-F., Broze, G.J.J., Morser, J.,* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficient mice. *Front. Biosci.* 2002, 7, d556–68.

11. *Diamond, S.L.,* Systems analysis of thrombus formation. *Circ. Res.* 2016, 118, 1348–1362.

12. *Lippi, G., Favaloro, E.J.,* Venous and arterial thromboses: two sides of the same coin? *Semin. Thromb. Hemost.* 2018, 44, 239–248.

13. *Silvain, J., Collet, J.-P., Nagaswami, C., Beygui, F., Edmondson, K. E., Bellemain-Appaix, A., Cayla, G., Pena, A., Brugier, D., Barthelemy, O., Montalescot, G., Weisel, J.W.,* Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011, 57, 1359–1367.

14. *Shibeko, A.M., Lobanova, E.S., Panteleev, M.A., Ataullakhanov, F.I.,* Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst. Biol.* 2010, 4, 5.

15. *Kuprash, A. D., Shibeko, A. M., Vijay, R., Nair, S. C., Srivastava, A., Ataullakhanov, F. I., Panteleev, M. A., Balandina, A. N.,* Sensitivity and robustness of spatially dependent thrombin generation and fibrin clot propagation. *Biophys. J.* 2018, 115, 2461–2473.

16. *Middeldorp, S.,* van Hylckama Vlieg, A., Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br. J. Haematol.* 2008, 143, 321–335.

17. *Martinelli, I., De Stefano, V., Mannucci, P. M.,* Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol.* 2014, 11, 140–156.

18. *Mannucci, P. M., Franchini, M.,* The real value of thrombophilia markers in identifying patients at high risk of venous thromboembolism. *Expert Rev. Hematol.* 2014, 7, 757–765.

19. *Campello, E., Spiezia, L., Adamo, A., Simioni, P.,* Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev. Hematol.* 2019, 12, 147–158.

20. *Wu, O., Bayoumi, N., Vickers, M.A., Clark, P.,* ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6, 62–69.

21. *Caprini, J.A.,* Thrombosis risk assessment as a guide to quality patient care. *Dis. Mon.* 2005, 51, 70–78.

22. *Patnaik, M.M., Moll, S.,* Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008, 14, 1229–1239.

23. *Tufano, A., Coppola, A., Cerbone, A. M., Ruosi, C., Franchini, M.,* Preventing postsurgical venous thromboembolism: pharmacological approaches. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011, 37, 252–266.

24. *Gould, M. K., Garcia, D. A., Wren, S. M., Karanicolas, P. J., Arcelus, J. I., Heit, J. A., Samama, C. M.,* Prevention of VTE in nonorthopedic surgical patients: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2012, 141, e227S-e277S.

25. *Parunov, L.A., Soshitova, N.P., Ovanesov, M.V, Panteleev, M.A., Serebriyskiy, I. I.,* Epidemiology of venous thromboembolism (VTE) associated with pregnancy. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 2015, 105, 167–184.

26. *Freour, P., Blanquet, P., Bernadou, M., Beck, C.,* On pulmonary scintigraphy]. *Poumon Coeur* 1967, 23, 243–249.

27. *Horsted, F., West, J., Grainge, M. J.,* Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2012, 9, e1001275.

28. *Al-Ani, F., Chehade, S., Lazo-Langner, A.,* Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thromb. Res.* 2020, 192, 152–160.

29. *Zivkovic, R.V, Kostic, M. M., Siems, W., Werner, A., Mojsilovic, L.P., Gerber, G.,* Effects of phenylhydrazine hydrochloride on energy metabolism in rabbit erythrocytes and reticulocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1990, 49, S172–7.

30. *Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., Delabranche, X., Merdji, H., Clere-Jehl, R., Schenck, M., Fagot Gandet, F., Fafi-Kremer, S., Castelain, V., Schneider, F., Grunebaum, L., Anglés-Cano, E., Sattler, L., Mertes, P.-M., Meziani, F.,* High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2020, 46, 1089–1098.

31. *Schafer, A.I.,* Thrombocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 1211–1219.

32. *Sandrock-Lang, K., Wentzell, R., Santoso, S., Zieger, B.,* Inherited platelet disorders. *Hamostaseologie* 2016, 36, 178–186.

33. *Casari, C., Bergmeier, W.,* Acquired platelet disorders. *Thromb. Res.* 2016, 141 Suppl 2, S73–5.

34. *Thiebaut, A. M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., Roussel, B.D.,* The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet. Neurol.* 2018, 17, 1121–1132.

35. *Wiyeh, A.B., Ochodo, E.A., Wiysonge, C.S., Kakia, A., Awotedu, A. A., Ristic, A., Mayosi, B. M.,* A systematic review of the efficacy and safety of intrapericardial fibrinolysis in patients with pericardial effusion. *Int. J. Cardiol.* 2018, 250, 223–228.

36. *Luc, N. F., Rohner, N., Girish, A., Didar Singh Sekhon, U., Neal, M.D., Sen Gupta, A.,* Bioinspired artificial platelets: past, present and future. *Platelets* 2022, 33, 35–47.

37. *Ataullakhanov, F.I., Koltsova, E.M., Balandina, A.N., Serebriyskiy, I. I., Vuimo, T.A., Panteleev, M.A.,* Classic and global hemostasis testing in pregnancy and during pregnancy complications. *Semin. Thromb. Hemost.* 2016, 42, 696–716.

38. *Levy, J.H., Szlam, F., Wolberg, A.S., Winkler, A.,* Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin. Lab. Med.* 2014, 34, 453–477.

39. *Flanders, M.M., Crist, R., Rodgers, G.M.,* Comparison of five thrombin time reagents. *Clin. Chem.* 2003, 49, 169–172.

40. *Panzer, S., Jilma, P.,* Methods for testing platelet function for transfusion medicine. *Vox Sang.* 2011, 101, 1–9.

41. *Tynngård, N., Lindahl, T.L., Ramström, S.,* Assays of different aspects of haemostasis – what do they measure? *Thromb. J.* 2015, 13, 8.

42. *Panteleev, M.A., Hemker, H.C.,* Global/integral assays in hemostasis diagnostics: promises, successes, problems and prospects. *Thromb. J.* 2015, 13, 5.

43. *Panteleev, M.A., Dashkevich, N.M., Ataullakhanov, F.I.,* Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb. Res.* 2015, 136, 699–711.

44. *Vincelot, A., Nathan, N., Collet, D., Mehaddi, Y., Grandchamp, P., Julia, A.,* Platelet function during pregnancy: an evaluation using the PFA-100 analyser. *Br. J. Anaesth.* 2001, 87, 890–893.

45. *Favaloro, E.J.,* Internal quality control and external quality assurance of platelet function tests. *Semin. Thromb. Hemost.* 2009, 35, 139–149.

46. *Ogawa, S., Hosokawa, K., Tanaka, K.A.,* Influences of hemodilution and anticoagulation on antiplatelet P2Y12 therapy: in vitro whole blood perfusion model. J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 2013, 27, e69–71.

47. *Hemker, H.C., Wielders, S., Kessels, H., Béguin, S.,* Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. Thromb. Haemost. 1993, 70, 617–624.

48. *Dielis, A.W.J. H., Castoldi, E., Spronk, H.M.H., van Oerle, R., Hamulyák, K., Ten Cate, H., Rosing, J.,* Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. J. Thromb. Haemost. 2008, 6, 125–131.

49. v*an Veen, J.J., Gatt, A., Cooper, P.C., Kitchen, S., Bowyer, A.E., Makris, M.,* Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. Blood Coagul. fibrinolysis an Int. J. Haemost. Thromb. 2008, 19, 183–189.

50. *Lipets, E.N., Ataullakhanov, F.I.,* Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. Thromb. J. 2015, 13, 4.

51. *Ninivaggi, M., Apitz-Castro, R., Dargaud, Y., de Laat, B., Hemker, H.C., Lindhout, T.,* Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. Clin. Chem. 2012, 58, 1252–1259.

52. *Antovic, A.,* The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. Semin. Thromb. Hemost. 2010, 36, 772–779.

53. *Parunov, L.A., Soshitova, N.P., Fadeeva, O.A., Balandina, A.N., Kopylov, K.G., Kumskova, M.A., Gilbert, J.C., Schaub, R.G., McGinness, K.E., Ataullakhanov, F.I., Panteleev, M.A.,* Drug-drug interaction of the anti-TFPI aptamer BAX499 and factor VIII: studies of spatial dynamics of fibrin clot formation in hemophilia A. Thromb. Res. 2014, 133, 112–119.

54. *Koltsova, E.M., Kuprash, A.D., Dashkevich, N.M., Vardanyan, D.M., Chernyakov, A.V, Kumskova, M.A., Nair, S.C., Srivastava, A., Ataullakhanov, F. I., Panteleev, M.A., Balandina, A.N.,* Determination of fibrin clot growth and spatial thrombin propagation in the presence of different types of phospholipid surfaces. Platelets 2021, 32, 1031–1037.

55. *Ignatova, A.A., Ponomarenko, E.A., Polokhov, D.M., Suntsova, E.V, Zharkov, P.A., Fedorova, D.V, Balashova, E.N., Rudneva, A.E., Ptushkin, V.V, Nikitin, E.A., Shcherbina, A., Maschan, A.A., Novichkova, G.A., Panteleev, M. A.,* Flow cytometry for pediatric platelets. Platelets 2019, 30, 428–437.

56. *Федорова, Д.В., Жарков, П.А., Игнатова, А.А., Федотов, А.Ю., Полохов, Д.М., Полетаев, А.В., Серегина, Е.А., Пшонкин, А.В.,* Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии. Вопросы Гематологии/Онкологии и Иммунопатологии в Педиатрии 2018, 17, 16–22.

57. *Suntsova, E.V, Demina, I.M., Ignatova, A.A., Ershov, N.M., Trubina, N. M., Dobrynina, J., Serkova, I. V, Supik, Z.S., Orekhova, E.V, Hachatryan, L.A., Kotskaya, N.N., Pshonkin, A.V, Maschan, A.A., Novichkova, G.A., Panteleev, M. A.,* Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. Int. J. Hematol. 2017, 105, 841–848.

58. *Masuda, M., Ueta, T., Shiba, K., Iwamoto, Y.,* D-dimer screening for deep venous thrombosis in traumatic cervical spinal injuries. Spine J. 2015, 15, 2338–2344.

59. *Атауллаханов, Ф.И., Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Синауридзе, Е. И., Зейналов, А.М.,* Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018, 17, 108–116.

60. *Kim, J., Lee, H., Shin, S.,* Advances in the measurement of red blood cell deformability: a brief review. J. Cell. Biotechnol. 2015, 1, 63–79.

61. *Maeda, N.,* Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn. J. Physiol.* 1996, 46, 1–14.

62. *Danielczok, J., Terriac, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Lautenschlaeger, F., Laschke, M., Kaestner, L.,* Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient Ca2+-mediated adaptations. *Front. Physiol.* 2017, 8, 979.

63. *Pretini, V., Koenen, M.H., Kaestner, L., Fens, M.H. A.M., Schiffelers, R.M., Bartels, M., Van Wijk, R.,* Red blood cells: chasing interactions. *Front. Physiol.* 2019, 10, 945.

64. *Tomc, J., Debeljak, N.,* Molecular insights into the oxygen-sensing pathway and erythropoietin expression regulation in erythropoiesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7074.

65. *Mithoowani, S., Laureano, M., Crowther, M. A., Hillis, C. M.*, Investigation and management of erythrocytosis. *CMAJ* 2020, 192, E913–E918.

66. *Mallik, N., Das, R., Malhotra, P., Sharma, P.,* Congenital erythrocytosis. *Eur. J. Haematol.* 2021, 107, 29–37.

67. *Maran, J., Prchal, J.,* Polycythemia and oxygen sensing. *Pathol. Biol. (Paris).* 2004, 52, 280–284.

68. *Nathany, S., Koulmane Laxminarayana, S. L., Tewari, S., Belurkar, S., Khanna, R., Manohar, C.,* Impact of World Health Organization (WHO) Revised Criteria-2016 on the Diagnosis of Polycythemia Vera. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2020, 36, 477–483.

69. *Purandare, A.V., Lorenzi, M.V., Lombardo, L.J., in: Macor, J. (Ed.)*, Annual Reports in Medicinal Chemistry. Academic Press 2010, pp. 210–227.

70. *James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J. L.,* Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434, 1144–1148.

71. *Scott, L. M., Tong, W., Levine, R. L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W. N., McMullin, M. F., Harrison, C.N., Warren, A. J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R.,* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356, 459–468.

72. *Ma, X., Vanasse, G., Cartmel, B., Wang, Y., Selinger, H. A.,* Prevalence of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Hematol.* 2008, 83, 359–362.

73. *Шуваев, В.А.,* Оптимизация программ диагностики и лечения больных миелопролиферативными новообразованиями. 2020.

74. Фоливодефицитная анемия. Клинические рекомендации Национального Гематологического Общества. 2020.

75. *Falchi, L., Newberry, K.J., Verstovsek, S.,* New therapeutic approaches in Polycythemia Vera. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* 2015, 15 Suppl, S27–33.

76. *Shallis, R.M., Podoltsev, N.A.,* Emerging agents and regimens for polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Biomark. Res.* 2021, 9, 40.

77. *Ang, S.O., Chen, H., Gordeuk, V.R., Sergueeva, A.I., Polyakova, L.A., Miasnikova, G.Y., Kralovics, R., Stockton, D.W.,* Prchal, J.T., Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2002, 28, 57–62.

78. *Pastore, Y., Jedlickova, K., Guan, Y., Liu, E., Fahner, J., Hasle, H., Prchal, J.F., Prchal, J.T.,* Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 73, 412–419.

79. *Soliman, D.S., Yassin, M.,* Congenital methemoglobinemia misdiagnosed as polycythemia vera: case report and review of literature. *Hematol. Rep.* 2018, 10, 7221.

80. *Kutayli, W.M., Silberstein, P., in: Enna, S.J., Bylund, D. (Eds.),* XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, New York 2007, pp. 1–5.

81. *Haider, M.Z., Anwer, F.,* StatPearls Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls, Treasure Island (FL) 2022.

82. *McMullin, M.F., Harrison, C.N., Ali, S., Cargo, C., Chen, F., Ewing, J., Garg, M.,* Godfrey, A., S, S. K., McLornan, D.P., Nangalia, J., Sekhar, M., Wadelin, F., Mead, A.J., A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology guideline. *Br. J. Haematol.* 2019, 184, 176–191.

83. *Cervi, A., Balitsky, A.K.,* Testosterone use causing erythrocytosis. *CMAJ* 2017, 189, E1286–E1288.

84. *Bachman, E., Travison, T.G., Basaria, S., Davda, M.N., Guo, W., Li, M.,* Connor Westfall, J., Bae, H., Gordeuk, V., Bhasin, S., Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014, 69, 725–735.

85. *Mazer, C.D., Hare, G.M.T., Connelly, P. W., Gilbert, R. E., Shehata, N., Quan, A., Teoh, H., Leiter, L.A., Zinman, B., Jüni, P., Zuo, F., Mistry, N., Thorpe, K.E., Goldenberg, R.M., Yan, A.T., Connelly, K.A., Verma, S.,* Effect of empagliflozin on erythropoietin levels, iron stores, and red blood cell morphology in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Circulation* 2020, 141, 704–707.

86. *Chambellan, A., Chailleux, E., Similowski, T.,* Prognostic value of the hematocrit in patients with severe COPD receiving long-term oxygen therapy. *Chest* 2005, 128, 1201–1208.

87. *Rha, M.-S., Jeong, Y., Kim, J., Kim, C.-H., Yoon, J.-H., Cho, H.-J.,* Is obstructive sleep apnea associated with erythrocytosis? A systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* 2022, 7, 627–635.

88. Анемия. Всемирная организация здравоохранения, https://www.who.int/ru/health-topics/anaemia#tab=tab_1 (last time accessed: February 13, 2023).

89. *Румянцев А.Г.,* Классификация и диагностика анемий у детей. *Вопросы современной педиатрии* 2011, 10, 94–102.

90. *Auerbach, A.D.,* Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2009, 668, 4–10.

91. *Da Costa, L., O'Donohue, M.-F., van Dooijeweert, B., Albrecht, K., Unal, S., Ramenghi, U., Leblanc, T., Dianzani, I., Tamary, H., Bartels, M., Gleizes, P.-E., Wlodarski, M., MacInnes, A.W.,* Molecular approaches to diagnose Diamond-Blackfan anemia: The EuroDBA experience. *Eur. J. Med. Genet.* 2018, 61, 664–673.

92. *Mangla, A., Hamad, H.,* StatPearls Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls 2022.

93. *Gadhiya, K., Wills, C.,* StatPearls Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls 2022.

94. *Engidaye, G., Melku, M., Enawgaw, B.,* Diamond Blackfan anemia: genetics, pathogenesis, diagnosis and treatment. *EJIFCC* 2019, 30, 67–81.

95. *Mary Wang,* Iron deficiency and other types of anemia in infants and children. *Am Fam Physician* 2016, 93, 270–278.

96. *Kamiya, T., Manabe, A.,* Congenital dyserythropoietic anemia. *Int. J. Hematol.* 2010, 92, 432–438.

97. *Liljeholm, M., Irvine, A.F., Vikberg, A.-L., Norberg, A., Month, S., Sandström, H., Wahlin, A., Mishima, M., Golovleva, I.,* Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23. *Blood* 2013, 121, 4791–4799.

98. *Roy, N.B.A., Babbs, C.,* The pathogenesis, diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anaemia type I. *Br. J. Haematol.* 2019, 185, 436–449.

99. *Fujino, H., Doisaki, S., Park, Y.-D., Hama, A., Muramatsu, H., Kojima, S., Sumimoto, S.,* Congenital dyserythropoietic anemia type 1 with a novel mutation in the CDAN1 gene previously diagnosed as congenital hemolytic anemia. *Int. J. Hematol.* 2013, 97, 650–653.

100. *Achille Iolascon, Roberta Russo, Maria Rosaria Esposito, Roberta Asci, Carmelo Piscopo, Silverio Perrotta, Madeleine Fénéant-Thibault, Loïc Garçon, Jean Delaunay,*

Molecular analysis of 42 patients with congenital dyserythropoietic anemia type II: new mutations in the SEC23B gene and a search for a genotype-phenotype relationship. *Haematologica* 2010, 95, 708–715.

101. *Kohara, H., Utsugisawa, T., Sakamoto, C., Hirose, L., Ogawa, Y., Ogura, H., Sugawara, A., Liao, J., Aoki, T., Iwasaki, T., Asai, T., Doisaki, S., Okuno, Y., Muramatsu, H., Abe, T., Kurita, R., Miyamoto, S., Sakuma, T., Shiba, M., Yamamoto, T., Ohga, S., Yoshida, K., Ogawa, S., Ito, E., Kojima, S., Kanno, H., Tani, K.,* KLF1 mutation E325K induces cell cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic anemia patient-specific induced pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* 2019, 73, 25–37.E8.

102. *Tefferi, A.,* Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2018, 93, 1551–1560.

103. *Zhilyaev, V.M., Arapova, S.D., Mamedova, E.O., Tarbaeva, N.V., Belaya, Z.E.,* Osteopetrosis: the follow-up of the disease in a patient who underwent hematopoietic stem cell transplantation at the age of 27 years. *Osteoporos. Bone Dis.* 2021, 23, 14–19.

104. *Camaschella, C., Poggiali, E.,* Inherited disorders of iron metabolism. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011, 23, 14–20.

105. *Camaschella, C.,* How I manage patients with atypical microcytic anaemia. *Br. J. Haematol.* 2012, 160, 12–24.

106. *Лохматова, М.Е., Сметанина, Н.С.,* Генетически обусловленные нарушения обмена железа. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2017, 6, 83–91.

107. *Cappellini, M. D., Musallam, K. M., Taher, A. T.,* Iron deficiency anaemia revisited. *J. Intern. Med.* 2020, 287, 153–170.

108. *Abu-Zeinah, G., DeSancho, M. T.,* Understanding sideroblastic anemia: an overview of genetics, epidemiology, pathophysiology and current therapeutic options. *J. Blood Med.* 2020, 11, 305–318.

109. T*o-Figueras, J., Ducamp, S., Clayton, J., Badenas, C., Delaby, C., Ged, C., Lyoumi, S., Gouya, L., de Verneuil, H., Beaumont, C., Ferreira, G. C., Deybach, J.-C., Herrero, C., Puy, H.,* ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. *Blood* 2011, 118, 1443–1451.

110. *Miyajima, H., Hosoi, Y.,* Aceruloplasminemia summary genetic counseling. *GeneReviews* 2019, 1–19.

111. *Ogimoto, M., Anzai, K., Takenoshita, H., Kogawa, K., Akehi, Y., Yoshida, R., Nakano, M., Yoshida, K., Ono, J.,* Criteria for early identification of aceruloplasminemia. *Intern. Med.* 2011, 50, 1415–1418.

112. *Hariz, A., Bhattacharya, P.T.,* StatPearls Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), Treasure Island (FL) 2022, p. 10.

113. *Aminoff, M., Carter, J. E., Chadwick, R. B., Johnson, C., Gräsbeck, R., Abdelaal, M.A., Broch, H., Jenner, L.B., Verroust, P.J., Moestrup, S.K., Chapelle, A. de la, Krahe, R.,* Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat. Genet.* 1999, 21, 309–313.

114. *Yang, Y.M., Ducos, R., Rosenberg, A. J., Catrou, P.G., Levine, J.S., Podell, E.R., Allen, R.H.,* Cobalamin malabsorption in three siblings due to an abnormal intrinsic factor that is markedly susceptible to acid and proteolysis. *J. Clin. Invest.* 1985, 76, 2057–2065.

115. *Hakami, N., Neiman, P.E., Canellos, G.P., Lazerson, J.,* Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *N. Engl. J. Med.* 1971, 285, 1163–1170.

116. Фоливодефицитная Анемия. Москва 2020.

117. *Vincent Th. Ramaekers 1, and E. V. Q. 2,* Cerebral folate deficiency syndrome: early diagnosis, intervention and treatment strategies. *Nutrients* 2022, 14, 3096.

118. *Hilton, J.F., Christensen, K.E., Watkins, D., Raby, B.A., Renaud, Y., de la Luna, S., Estivill, X., MacKenzie, R. E., Hudson, T. J., Rosenblatt, D.S.,* The molecular basis of glutamate formiminotransferase deficiency. *Hum. Mutat.* 2003, 22, 67–73.

119. *Grohmann, K., Lauffer, H., Lauenstein, P., Hoffmann, G. F., Seidlitz, G.,* Hereditary orotic aciduria with epilepsy and without megaloblastic anemia. *Neuropediatrics* 2015, 46, 123–125.

120. *Longo, D.L., in: Jameson, J.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S. L., Longo, D.L., Loscalzo, J. (Eds.),* Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e. McGraw-Hill Education, New York, NY 2018.

121. *Grossi, C.E., Lydyard, P.M., in: Delves, P. J. B. T.-E. of I.* (Second E. (Ed.), Encyclopedia of Immunology. Elsevier, Oxford 1998, pp. 2205–2208.

122. *Gozzelino, R., Jeney, V., Soares, M.P.,* Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 50, 323–354.

123. *Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P.,* The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. *Jama J. Am. Med. Assoc.* 2015, 293, 1653–1662.

124. *Deuel, J.W., Schaer, C.A., Boretti, F.S., Opitz, L., Garcia-Rubio, I., Baek, J.H., Spahn, D.R., Buehler, P.W., Schaer, D.J.,* Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis.* 2016, 7, e2064–e2064.

125. *Boretti, F.S., Baek, J.H., Palmer, A.F., Schaer, D.J., Buehler, P.W.,* Modeling hemoglobin and hemoglobin:haptoglobin complex clearance in a non-rodent species-pharmacokinetic and therapeutic implications. *Front. Physiol.* 2014, 5, 385.

126. *Meegan, J.E., Bastarache, J.A., Ware, L.B.,* Toxic effects of cell-free hemoglobin on the microvascular endothelium: implications for pulmonary and nonpulmonary organ dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 2021, 321, L429–L439.

127. *Vallelian, F., Buehler, P.W., Schaer, D.J.,* Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics. *Blood* 2022, 140, 1837–1844.

128. *Schaer, D.J., Buehler, P.W., Alayash, A.I., Belcher, J.D., Vercellotti, G.M.,* Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood* 2013, 121, 1276–1284.

129. *Martins, R., Maier, J., Gorki, A.-D., Huber, K.V. M., Sharif, O., Starkl, P., Saluzzo, S., Quattrone, F., Gawish, R., Lakovits, K., Aichinger, M. C., Radic-Sarikas, B., Lardeau, C.-H., Hladik, A., Korosec, A., Brown, M., Vaahtomeri, K., Duggan, M., Kerjaschki, D., Esterbauer, H., Colinge, J., Eisenbarth, S. C., Decker, T., Bennett, K.L., Kubicek, S., Sixt, M., Superti-Furga, G., Knapp, S.,* Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nat. Immunol.* 2016, 17, 1361–1372.

130. *Engelking, L.R.,* Carbohydrate metabolism in erythrocytes. *Textb. Vet. Physiol. Chem.* 2015, 190–194.

131. *Brown, K.A.,* Erythrocyte metabolism and enzyme defects. *Lab. Med.* 1996, 27, 329–333.

132. *Solinge, V., W, W., Richard, van W., in: Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J. T., Levi, M. M., Press, O.W., Burns, L.J., Caligiuri, M. (Eds.),* Williams Hematology, 9e. McGraw-Hill Education, New York, NY 2015.

133. *Бовт, Е.А., Колева, Л.Д., Черняк, Е.А., Прудинник, Д.С., Атауллаханов, Ф.И., Сметанина, Н.С., Синауридзе, Е.И.,* Дефицит пируваткиназы и несфероцитарная гемолитическая анемия. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2020, 19, 121–130.

134. *Secrest, M.H., Storm, M., Carrington, C., Casso, D., Gilroy, K., Pladson, L., Boscoe, A.N.,* Prevalence of pyruvate kinase deficiency: A systematic literature review. *Eur. J. Haematol.* 2020, 105, 173–184.

135. *Kanno, H., Wei, D. C., Chan, L. C., Mizoguchi, H., Ando, M., Nakahata, T., Narisawa, K., Fujii, H., Miwa, S.,* Hereditary hemolytic anemia caused by diverse point mutations of pyruvate kinase gene found in Japan and Hong Kong. *Blood* 1994, 84, 3505–3509.

136. *Diez, A., Gilsanz, F., Martinez, J., Pérez-Benavente, S., Meza, N. W., Bautista, J. M.,* Life-threatening nonspherocytic hemolytic anemia in a patient with a null mutation in the PKLR gene and no compensatory PKM gene expression. *Blood* 2005, 106, 1851–1856.

137. *Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Chiarelli, L. R., Valentini, G.,* Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Rev.* 2007, 21, 217–231.

138. *Lenzner, B.C., Nu, P., Jacobasch, G., Gerth, C., Thiele, B.,* Molecular analysis of 29 pyruvate kinase – deficient patients from central Europe with hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1997, 89, 1793–1799.

139. *Branca, R., Costa, E., Rocha, S., Coelho, H., Quintanilha, A., Cabeda, J. M., Santos-Silva, A., Barbot, J.,* Coexistence of congenital red cell pyruvate kinase and band 3 deficiency. Clin. Lab. Haematol. 2004, 26, 297–300.

140. *Zarza, R., Moscardó, M., Alvarez, R., García, J., Morey, M., Pujades, A., Vives-Corrons, J. L.,* Co-existence of hereditary spherocytosis and a new red cell pyruvate kinase variant: PK mallorca. Haematologica 2000, 85, 227–232.

141. *Beutler, E., Forman, L.,* Coexistence of alpha-thalassemia and a new pyruvate kinase variant: PK Fukien. Acta Haematol. 1983, 69, 3–8.

142. *Vives Corrons, J. L., García, A.M., Sosa, A.M., Pujades, A., Colomer, D., Linares, M.,* Heterozygous pyruvate kinase deficiency and severe hemolytic anemia in a pregnant woman with concomitant, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Ann. Hematol. 1991, 62, 190–193.

143. *Grace, R.F., Bianchi, P., van Beers, E.J., Eber, S.W., Glader, B., Yaish, H.M., Despotovic, J.M., Rothman, J.A., Sharma, M., McNaull, M.M., Fermo, E., Lezon-Geyda, K., Morton, D.H., Neufeld, E.J., Chonat, S., Kollmar, N., Knoll, C.M., Kuo, K., Kwiatkowski, J.L., Pospíšilová, D., Pastore, Y.D., Thompson, A.A., Newburger, P.E., Ravindranath, Y., Wang, W.C., Wlodarski, M. W., Wang, H., Holzhauer, S., Breakey, V.R., Kunz, J., Sheth, S., Rose, M.J., Bradeen, H.A., Neu, N., Guo, D., Al-Sayegh, H., London, W.B., Gallagher, P.G., Zanella, A., Barcellini, W.,* Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency: data from the pyruvate kinase deficiency natural history study. *Blood* 2018, 131, 2183–2192.

144. *Al-Samkari, H., van Beers, E. J.,* Mitapivat, a novel pyruvate kinase activator, for the treatment of hereditary hemolytic anemias. *Ther. Adv. Hematol.* 2021, 12, 20406207211066070.

145. *Kuo, K.H.M., Layton, D.M., Lal, A., Al-Samkari, H., Bhatia, J., Kosinski, P.A., Tong, B., Lynch, M., Uhlig, K., Vichinsky, E.P.,* Safety and efficacy of mitapivat, an oral pyruvate kinase activator, in adults with non-transfusion dependent α-thalassaemia or β-thalassaemia: an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet* 2022, 400, 493–501.

146. *Zu, Y., Wang, H., Lin, W., Zou, C.,* Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia caused by glucose-6-phosphate isomerase (GPI) deficiency in a Chinese patient: a case report. *BMC Pediatr.* 2022, 22, 461.

147. *Kugler, W., Lakomek, M.,* Glucose-6-phosphate isomerase deficiency. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2000, 13, 89–101.

148. *Schröter, W., Eber, S. W., Bardosi, A., Gahr, M., Gabriel, M., Sitzmann, F.C.,* Generalised glucosephosphate isomerase (GPI) deficiency causing haemolytic anaemia, neuromuscular symptoms and impairment of granulocytic function: a new syndrome due to a new stable GPI variant with diminished specific activity (GPI Homburg). *Eur. J. Pediatr.* 1985, 144, 301–305.

149. *Zanella, A., Izzo, C., Rebulla, P., Perroni, L., Mariani, M., Canestri, G., Sansone, G., Sirchia, G.,* The first stable variant of erythrocyte glucose-phosphate isomerase associated with severe hemolytic anemia. *Am. J. Hematol.* 1980, 9, 1–11.

150. *Fermo, E., Vercellati, C., Marcello, A.P., Zaninoni, A., Aytac, S., Cetin, M., Capolsini, I., Casale, M., Paci, S., Zanella, A., Barcellini, W., Bianchi, P.,* Clinical and molecular spectrum of glucose-6-phosphate isomerase deficiency. Report of 12 new cases. *Front. Physiol.* 2019, 10, DOI: 10.3389/fphys.2019.00467.

151. *Schröter, W., Tillmann, W.,* Decreased deformability of erythrocytes in haemolytic anaemia associated with glucosephosphate isomerase deficiency. *Br. J. Haematol.* 1977, 36, 475–484.

152. *Read, J., Pearce, J., Li, X., Muirhead, H., Chirgwin, J., Davies, C.,* The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 A resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. *J. Mol. Biol.* 2001, 309, 447–463.

153. *Lin, H.-Y., Kao, Y.-H., Chen, S.-T., Meng, M.,* Effects of inherited mutations on catalytic activity and structural stability of human glucose-6-phosphate isomerase expressed in Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1794, 315–323.

154. *Paglia, D.F., Valentine, W.N.,* Hereditary glucosephosphate isomerase deficiency. A review. *Am. J. Clin. Pathol.* 1974, 62, 740–751.

155. *Jenkins, J.D., Kezdy, F.J., Steck, T.L.,* Mode of interaction of phosphofructokinase with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 10426–10433.

156. *Real-Hohn, A., Zancan, P., Da Silva, D., Martins, E.R., Salgado, L. T., Mermelstein, C.S., Gomes, A.M.O., Sola-Penna, M.,* Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes. *Biochimie* 2010, 92, 538–544.

157. *Vora, S., Davidson, M., Seaman, C., Miranda, A.F., Noble, N.A., Tanaka, K.R., Frenkel, E.P., Dimauro, S.,* Heterogeneity of the molecular lesions in inherited phosphofructokinase deficiency. *J. Clin. Invest.* 1983, 72, 1995–2006.

158. *Etiemble, J., Picat, C., Siméon, J., Blatrix, C., Boivin, P.,* Inherited erythrocyte phosphofructokinase deficiency: Molecular mechanism. *Hum. Genet.* 1980, 55, 383–390.

159. *Vives-Corrons, J.-L., Koralkova, P., Grau, J.M., Mañú Pereira, M.D. M., Van Wijk, R.,* First description of phosphofructokinase deficiency in spain: identification of a novel homozygous missense mutation in the PFKM gene. *Front. Physiol.* 2013, 4, 393.

160. *Harris, C., Nelson, B., Farber, D., Bickel, S., Huxol, H., Asamoah, A., Morton, R.,* Child neurology: triosephosphate isomerase deficiency. *Neurology* 2020, 95, e3448–e3451.

161. Orosz, F., Oláh, J., Ovádi, J., Triosephosphate isomerase deficiency: Facts and doubts. *IUBMB Life* 2006, 58, 703–715.

162. *Hollán, S., Fujii, H., Hirono, A., Hirono, K., Karro, H., Miwa, S., Harsányi, V., Gyódi, É., Inselt-Kovács, M.,* Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. *Hum. Genet.* 1993, 92, 486–490.

163. *VanDemark, A. P., Hrizo, S.L., Eicher, S.L., Kowalski, J., Myers, T. D., Pfeifer, M.R., Riley, K.N., Koeberl, D.D., Palladino, M.J.,* Itavastatin and resveratrol increase triosephosphate isomerase protein in a newly identified variant of TPI deficiency. *Dis. Model. Mech.* 2022, 15, dmm049261.

164. The portal for rare diseases and orphan drugs. Triose phosphate-isomerase deficiency.

165. *Bibl, D., Lampl, C., Gabriel, C., Jüngling, G., Brock, H., Köstler, G.,* Towards enzyme-replacement treatment in triosephosphate isomerase deficiency. *Lancet* 1999, 353, 1155–1156.

166. *Vogt, A., Eicher, S.L., Myers, T.D., Hrizo, S.L., Vollmer, L.L., Meyer, E.M., Palladino, M.J.,* A high-content screening assay for small molecules that stabilize mutant triose phosphate isomerase (TPI) as treatments for TPI deficiency. *SLAS Discov.* 2021, 26, 1029–1039.

167. *Dodgson, S.J., Lee, C.S., Holland, R.A., O'Sullivan, W.J., Vowels, M. R.,* Erythrocyte phosphoglycerate kinase deficiency: enzymatic and oxygen binding studies. *Aust. N.Z.J. Med.* 1980, 10, 614–621.

168. *Arese, P., Bosia, A., Gallo, E., Mazza, U., Pescarmona, G. P.,* Red cell glycolysis in a case of 3-phosphoglycerate kinase deficiency. *Eur. J. Clin. Invest.* 1973, 3, 86–92.

169. *Konrad, P.N., McCarthy, D.J., Mauer, A.M., Valentine, W.N., Paglia, D.E.,* Erythrocyte and leukocyte phosphoglycerate kinase deficiency with neurologic disease. *J. Pediatr.* 1973, 82, 456–460.

170. *Beutler, E.,* PGK deficiency. *Br. J. Haematol.* 2007, 136, 3–11.

171. *Ward, S.K., Stevens, C.A., Keates-Baleeiro, J., Bhakta, M.,* Therapeutic Benefit of Blood Transfusion in a Patient With Novel PGK1 Mutation (c.461T>C p.L154P]). *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2020, 42, e228–e230.

172. *Baba, K., Fukuda, T., Furuta, M., Tada, S., Imai, A., Asano, Y., Sugie, H., P Takahashi, M., Mochizuki, H.,* A Mild Clinical Phenotype with Myopathic and Hemolytic Forms of Phosphoglycerate Kinase Deficiency (PGK Osaka): A Case Report and Literature Review. *Intern. Med.* 2022, 61, 3589–3594.

173. *Rosa, R., George, C., Fardeau, M., Calvin, M.C., Rapin, M., Rosa, J.,* A new case of phosphoglycerate kinase deficiency: PGK Creteil associated with rhabdomyolysis and lacking hemolytic anemia. *Blood* 1982, 60, 84–91.

174. *Tsujino, S., Tonin, P., Shanske, S., Nohria, V., Boustany, R.M., Lewis, D., Chen, Y.T., DiMauro, S.,* A splice junction mutation in a new myopathic variant of phosphoglycerate kinase deficiency (PGK North Carolina). *Ann. Neurol.* 1994, 35, 349–353.

175. *Ward, S.K., Stevens, C.A., Keates-Baleeiro, J., Bhakta, M.,* Therapeutic benefit of blood transfusion in a patient with novel PGK1 mutation (c.461T>C p.L154P]). *J Pediatr Hematol Oncol* 2020, 42, e228–e230.

176. *Yeltman, D.R., Harris, B.G.,* Localization and membrane association of aldolase in human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980, 199, 186–196.

177. *Perrotta, S., Borriello, A., Scaloni, A., De Franceschi, L., Brunati, A. M., Turrini, F., Nigro, V., del Giudice, E. M., Nobili, B., Conte, M. L., Rossi, F., Iolascon, A., Donella-Deana, A., Zappia, V., Poggi, V., Anong, W., Low, P., Mohandas, N., Della Ragione, F.,* The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: implications for band 3 function. *Blood* 2005, 106, 4359–4366.

178. *Chu, H., Low, P.S.,* Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem. J.* 2006, 400, 143–151.

179. *Miwa, S., Fujii, H., Tani, K., Takahashi, K., Takegawa, S., Fujinami, N., Sakurai, M., Kubo, M., Tanimoto, Y., Kato, T., Matsumoto, N.,* Two cases of red cell aldolase deficiency associated with hereditary hemolytic anemia in a japanese family. *Am. J. Hematol.* 1981, 11, 425–437.

180. *Keuder, J. et al., Brief Report : Inherited Metabolic Mutation in Aldolase a. N. Engl. J. Med.* 1996, 1100–1104.

181. *Yao, D.C., Tolan, D.R., Murray, M.F., Harris, D.J., Darras, B.T., Geva, A., Neufeld, E. J.,* Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA(Arg303X/Cys338Tyr). *Blood* 2004, 103, 2401–2403.

182. *Mamoune, A., Bahuau, M., Hamel, Y., Serre, V., Pelosi, M., Habarou, F., Nguyen Morel, M.A., Boisson, B., Vergnaud, S., Viou, M. T., Nonnenmacher, L., Piraud, M., Nusbaum, P., Vamecq, J., Romero, N., Ottolenghi, C., Casanova, J. L., de Lonlay, P.,* A thermolabile aldolase A mutant causes fever-induced recurrent rhabdomyolysis without hemolytic anemia. *PLoS Genet.* 2014, 10, DOI: 10.1371/journal.pgen.1004711.

183. *Papadopoulos, C., Svingou, M., Kekou, K., Vergnaud, S., Xirou, S., Niotakis, G., Papadimas, G. K.,* Aldolase A deficiency: Report of new cases and literature review. *Mol. Genet. Metab. Reports* 2021, 27, 100730.

184. *Santoro, L., Pjetraj, D., Velmishi, V., Campana, C., Catassi, C., Dionisi-Vici, C., Maiorana, A.,* A new phenotype of aldolase a deficiency in a 14 year-old boy with epilepsy and rhabdomyolysis – case report. *Ital. J. Pediatr.* 2022, 48, 1–5.

185. *Koralkova, P., Mojzikova, R., van Oirschot, B., Macartney, C., Timr, P., Vives Corrons, J.L., Striezencova Laluhova, Z., Lejhancova, K., Divoky, V., van Wijk, R.,* Molecular characterization of six new cases of red blood cell hexokinase deficiency yields four novel mutations in HK1. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2016, 59, 71–76.

186. *Boulard–Heitzmann, P., Boulard, M., Tallineau, C., Boivin, P., Tanzer, J., Bois, M., Barriere, M.,* Decreased red cell enolase activity in a 40-year–old woman with compensated haemolysis. *Scand. J. Haematol.* 1984, 33, 401–404.

187. *Beutler, E.,* Disorders due to enzyme defects in the red blood cell. *Adv. Metab. Disord.* 1972, 60, 131–160.

188. *Gallagher, P. G.,* Hemolytic Anemias: Red Cell Membrane and Metabolic Defects. Elsevier Inc. 2012.

189. *Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R.,* Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Update and analysis of new mutations around the world. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, DOI: 10.3390/ijms17122069.

190. *Белов, А.И., Евдокимова, М.В., Мотина, А.Н., Ластовская, К.В., Чертков, С.В., Тиганов, А.Р., Асатрян, А.В., Степченко, М.А.,* Наследственная гемолитическая анемия, связанная с дефицитом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов. *Современные проблемы науки и образования* 2020, 2.

191. *Kirkman, H.N., Hendrickson, E.M.,* Glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. II. Subactive states of the enzyme from normal persons. *J. Biol. Chem.* 1962, 237, 2371–2376.

192. *Nkhoma, E.T., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. A., Beutler, E.,* The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2009, 42, 267–278.

193. World Health Organisation, Malaria policy advisory group meeting - technical consultation to review the classification of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). 2022, 1–20.

194. *Beutler, E., Kuhl, W., Gelbart, T.,* 6-Phosphogluconolactonase deficiency, a hereditary erythrocyte enzyme deficiency: possible interaction with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985, 82, 3876–3878.

195. *Caprari, P., Caforio, M.P., Cianciulli, P., Maffi, D., Pasquino, M.T., Tarzia, A., Amadori, S., Salvati, A.M.,* 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. *Ann. Hematol.* 2001, 80, 41–44.

196. *Vives Corrons, J.L., Colomer, D., Pujades, A., Rovira, A., Aymerich, M., Merino, A., Aguilar i Bascompte, J. L.,* Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. *Am. J. Hematol.* 1996, 53, 221–227.

197. *Ristoff, E., Larsson, A.,* Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J. Rare Dis.* 2007, 2, 16.

198. Njålsson, R., Ristoff, E., Carlsson, K., Winkler, A., Larsson, A., Norgren, S., Genotype, enzyme activity, glutathione level, and clinical phenotype in patients with glutathione synthetase deficiency. *Hum. Genet.* 2005, 116, 384–389.

199. *Ristoff, E., Mayatepek, E., Larsson, A.,* Long-term clinical outcome in patients with glutathione synthetase deficiency. *J. Pediatr.* 2001, 139, 79–84.

200. *Huang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E., Meister, A.,* Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 19675–19680.

201. *Beutler, E., Moroose, R., Kramer, L., Gelbart, T., Forman, L.,* Gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* 1990, 75, 271–273.

202. *Hirono, A., Iyori, H., Sekine, I., Ueyama, J., Chiba, H., Kanno, H., Fujii, H., Miwa, S.,* Three cases of hereditary nonspherocytic hemolytic anemia associated with red blood cell glutathione deficiency. *Blood* 1996, 87, 2071–2074.

203. *Beutler, E., Gelbart, T., Pegelow, C.,* Erythrocyte glutathione synthetase deficiency leads not only to glutathione but also to glutathione-S-transferase deficiency. *J. Clin. Invest.* 1986, 77, 38–41.

204. *Mañú Pereira, M., Gelbart, T., Ristoff, E., Crain, K.C., Bergua, J. M., López Lafuente, A., Kalko, S.G., García Mateos, E., Beutler, E., Vives Corrons, J. L.,* Chronic non-spherocytic hemolytic anemia associated with severe neurological disease due to gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency in a patient of Moroccan origin. *Haematologica* 2007, 92, 102–105.

205. *Beutler, E., Gelbart, T., Kondo, T., Matsunaga, A. T.,* The molecular basis of a case of γ-glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood* 1999, 94, 2890–2894.

206. *Flatz, G.,* Population study of erythrocyte glutathione reductase activity. *Humangenetik* 1971, 11, 278–285.

207. *Loos, H., Roos, D., Weening, R., Houwerzijl, J.,* Familial deficiency of glutathione reductase in human blood cells. *Blood* 1976, 48, 53–62.

208. *Beutler, E.,* Red cell enzyme defects as nondiseases and as diseases. *Blood* 1979, 54, 1–7.

209. *Johnson, R.M., Goyette, G.J., Ravindranath, Y.,* Ho, Y.S., Red cells from glutathione peroxidase-1-deficient mice have nearly normal defenses against exogenous peroxides. *Blood* 2000, 96, 1985–1988.

210. *Атауллаханов, Ф.И.,* Регуляция метаболизма в эритроцитах. Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. 1982.

211. *Витвицкий В.М.,* Использование эритроцитов в качестве переносчиков противоопухолевых препаратов. диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. 2014.

212. R*apoport, I., Rapoport, S.M., Gerber, G.,* Degradation of AMP in erythrocytes of man. Evidence for a cytosolic phosphatase activity. *Biomed. Biochim. Acta* 1987, 46, 317–329.

213. *Paglia, D.E., Valentine, W.N., Nakatani, M., Brockway, R.A.,* Mechanisms of adenosine 5'-monophosphate catabolism in human erythrocytes. *Blood* 1986, 67, 988–992.

214. *He, S., Chen, H., Guo, X., Gao, J.,* Red cell adenylate kinase deficiency in China : molecular study of 2 new mutations (413G > A , 223dupA). *BMC Med. Genomics* 2022, 1–8.

215. *Lagresle-Peyrou, C., Six, E.M., Picard, C., Rieux-Laucat, F., Michel, V., Ditadi, A., Chappedelaine, C.D., Morillon, E., Valensi, F., Simon-Stoos, K.L., Mullikin, J.C., Noroski, L.M., Besse, C., Wulffraat, N.M., Ferster, A., Abecasis, M.M., Calvo, F., Petit, C., Candotti, F., Abel, L., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M.,* Human adenylate kinase

2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* 2009, 41, 106–111.

216. *Kuhl, W., West, C., Westwood, B.,* Metabolic Compensation for Profound Erythrocyte Adenylate Kinase Deficiency. 1983, 72, 648–655.

217. *Toren, A., Brok-Simoni, F., Ben-Bassat, I., Holtzman, F., Mandel, M., Neumann, Y., Ramot, B., Rechavi, G., Kende, G.,* Congenital haemolytic anaemia associated with adenylate kinase deficiency. *Br. J. Haematol.* 1994, 87, 376–380.

218. *Miwa, S., Fujii, H., Tani, K., Takahashi, K., Takizawa, T., Igarashi, T.,* Red cell adenylate kinase deficiency associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia: clinical and biochemical studies. *Am. J. Hematol.* 1983, 14, 325–333.

219. *Szeinberg, A., Kahana, D., Gavendo, S., Zaidm, J., R, J. it h B.-E.,* Hereditary deficiency of adenylate kinase in red blood cells within the frame of an investigation of this genetic trait in different population groups in Israel a blood sample demonstrating a deficiency of adenylate kinase (AK) in red cells was encounte. *Acta Haematol.* 1969, 42, 111–126.

220. *Abrusci, P., Chiarelli, L.R., Galizzi, A., Fermo, E., Bianchi, P., Zanella, A., Valentini, G.,* Erythrocyte adenylate kinase deficiency: characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia. *Exp. Hematol.* 2007, 35, 1182–1189.

221. *Valentine, W.N., Paglia, D.E., Tartaglia, A.P., Gilsanz, F.,* Hereditary hemolytic anemia with increased red cell adenosine deaminase (45- to 70-fold) and decreased adenosine triphosphate. *Science (80-.).* 1977, 195, 783–785.

222. *Pérignon, J.L., Hamet, M., Buc, H.A., Cartier, P.H., Derycke, M.,* Biochemical study of a case of hemolytic anemia with increased (85 fold) red cell adenosine deaminase. *Clin. Chim. acta* 1982, 124, 205–212.

223. *Chottiner, E., Ginsburg, D., Tartaglia, A., Mitchell, B.,* Erythrocyte adenosine deaminase overproduction in hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1989, 74, 448–453.

224. *Chen, E.H., Tartaglia, A.P., Mitchell, B. S.,* Hereditary overexpression of adenosine deaminase in erythrocytes: evidence for a cis-acting mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 1993, 53, 889–893.

225. *Miwa, S., Fujii, H., Matsumoto, N., Nakatsuji, T., Oda, S., Asano, H., Asano, S.,* A case of red-cell adenosine deaminase overproduction associated with hereditary hemolytic anemia found in Japan. *Am. J. Hematol.* 1978, 5, 107–115.

226. *Fujii, H., Miwa, S., Suzuki, K.,* Purification and properties of adenosine deaminase in normal and hereditary hemolytic anemia with increased red cell activity. *Hemoglobin* 1980, 4, 693–705.

227. *Chiarelli, L.R., Fermo, E., Zanella, A., Valentini, G.,* Hereditary erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: a biochemical, genetic and clinical overview. *Hematology* 2006, 11, 67–72.

228. *Report, P.-D. A.C., Köker, S.A., Bianchi, P., Fermo, E., Karapinar, T. H., Gözmen, S., Ay, Y., Vergin, R.C.,* A New Homozygous Mutation (c.393-394del TA/c.393-394del TA) in the NT5C3 Gene Associated With Pyrimidine-5′-Nucleotidase Deficiency: A Case Report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019, 41, 484–486.

229. *Chiarelli, L.R., Morera, S.M., Galizzi, A., Fermo, E., Zanella, A., Valentini, G.,* Molecular basis of pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency caused by 3 newly identified missense mutations (c.187T>C, c.469G>C and c.740T>C) and a tabulation of known mutations. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2008, 40, 295–301.

230. *Chiarelli, L.R., Bianchi, P., Fermo, E., Galizzi, A., Iadarola, P., Mattevi, A., Zanella, A., Valentini, G.,* Functional analysis of pyrimidine 5′-nucleotidase mutants causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 2005, 105, 3340–3345.

231. *Amici, A., Emanuelli, M., Magni, G., Raffaelli, N., Ruggieri, S.,* Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. *FEBS Lett.* 1997, 419, 263–267.

232. *Swanson, M.S., Markin, R.S., Stohs, S.J., Angle, C.R.,* Identification of cytidine diphosphodiesters in erythrocytes from a patient with pyrimidine nucleotidase deficiency. *Blood* 1984, 63, 665–670.

233. *Tomoda, A., Noble, N.A., Lachant, N.A., Tanaka, K.R.,* Hemolytic anemia in hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: nucleotide inhibition of G6PD and the pentose phosphate shunt. *Blood* 1982, 60, 1212–1218.

234. *Oda, E., Oda, S., Tomoda, A., Lachant, N.A., Tanaka, K.R.,* Hemolytic anemia in hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. II. Effect of pyrimidine nucleotides and their derivatives on glycolytic and pentose phosphate shunt enzyme activity. *Clin. Chim. Acta.* 1984, 141, 93–100.

235. *Lachant, N.A., Tanaka, K.R.,* Red cell metabolism in hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: effect of magnesium. *Br. J. Haematol.* 1986, 63, 615–623.

236. *Lachant, N.A., Zerez, C.R., Tanaka, K.R.,* Pyrimidine nucleotides impair phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) synthetase subunit aggregation by sequestering magnesium. A mechanism for the decreased PRPP synthetase activity in hereditary erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1989, 994, 81–88.

237. *Lachant, N.A., Zerez, C.R., Tanaka, K.R.,* Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase hyperactivity in hereditary erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *Br. J. Haematol.* 1987, 66, 91–96.

238. *Martinov, M.V., Plotnikov, A.G., Vitvitsky, V.M., Ataullakhanov, F. I.,* Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1474, 75–87.

239. *Zanella, A., Bianchi, P.,* Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2000, 13, 57–81.

240. *Bianchi, P., Fermo, E., Glader, B., Kanno, H., Agarwal, A., Barcellini, W., Eber, S., Hoyer, J.D., Kuter, D.J., Maia, T.M., Mañu-Pereira, M. D. M., Kalfa, T.A., Pissard, S., Segovia, J.-C., van Beers, E., Gallagher, P.G., Rees, D.C., van Wijk, R.,* Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. *Am. J. Hematol.* 2019, 94, 149–161.

241. Recommended methods for the characterization of red cell pyruvate kinase variants. International committee for standardization in haematology. *Br. J. Haematol.* 1979, 43, 275–286.

242. *Черняк Е.А.,* Молекулярно-генетическая диагностика и эффективность различных опций терапии дефицита пируваткиназы у детей. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. 2021.

243. *Lux, S.E.,* Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions. *Blood* 2016, 127, 187–199.

244. *Ataullakhanov, F.I., Borsakova, D.V, Protasov, Y.S., Sinauridze, E.I., Zeynalov, A.M.,* Erythrocyte: a bag with hemoglobin, or a living active cell? *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* 2018, 17, 108–116.

245. *Markin, V.S.,* Lateral organization of membranes and cell shapes. *Biophys. J.* 1981, 36, 1–19.

246. *Svetina, S., Kuzman, D., Waugh, R.E., Ziherl, P., Žekš, B.,* The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 2004, 62, 107–113.

247. *Gallagher, P.G.,* Red cell membrane disorders. *Hematology* 2005, 2005, 13–18.

248. *Risinger, M., Kalfa, T.A.,* Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood* 2020, 136, 1250–1261.

249. Marko Stefanovic, Estela Puchulu-Campanella, Gayani Kodippili, and P.S.L., Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *Bone* 2012, 23, 1–7.

250. *Campanella, M.E., Chu, H., Low, P.S.,* Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, 102, 2402–2407.

251. *Narla, J., Mohandas, N.,* Red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hematol.* 2017, 39, 47–52.

252. *Eber, S., Lux, S.E.,* Hereditary Spherocytosis – Defects in Proteins That Connect the Membrane Skeleton to the Lipid Bilayer. *Semin. Hematol.* 2004, 41, 118–141.

253. *Eber, S.W., Gonzalez, J.M., Lux, M.L., Scarpa, A.L., Tse, W.T., Dornwell, M., Herbers, J., Kugler, W., Ozcan, R., Pekrun, A., Gallagher, P.G., Schroter, W., Forget, B.G., Lux, S.E.,* Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat. Genet.* 1996, 13, 214–218.

254. *Perrotta, S., Gallagher, P.G., Mohandas, N.,* Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008, 372, 1411–1426.

255. *Becker, P.S., Tse, W.T., Lux, S.E., Forget, B.G.,* β Spectrin kissimmee: A spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1. *J. Clin. Invest.* 1993, 92, 612–616.

256. *Brooks, A., Futrega, K., Liang, X., Hu, X., Liu, X., Crawford, D. H. G., Doran, M.R., Roberts, M.S., Wang, H.,* Concise review: quantitative detection and modeling the in vivo kinetics of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2018, 7, 78–86.

257. *Gallagher, P.G.*, Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* 2017, 130, 2699–2708.

258. *Agre Peter, Eugene P.* Orringer, V.B., Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *Med. Intell.* 1982, 306, 1155–1161.

259. Tachavanich, K., Tanphaichitr, V.S., Utto, W., Viprakasit, V., Rapid flow cytometric test using eosin-5-maleimide for diagnosis of red blood cell membrane disorders. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2009, 40, 570–575.

260. *Кузьминова, Ж.А., Плясунова, С. А., Жогов, В.В., Сметанина, Н.С.,* Цитометрический метод связывания эозин-5-малеимида в диагностике наследственного сфероцитоза. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016, 61, 168–172.

261. *Nicolas, V., Van Kim, C. Le, Gane, P., Birkenmeier, C., Cartron, J.P., Colin, Y., Mouro-Chanteloup,* I., Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rhnull-associated mutation. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 25526–25533.

262. *Gallagher, P.G.,* Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin. Hematol.* 2004, 41, 142–164.

263. *Harper, S.L., Sriswasdi, S., Tang, H.Y., Gaetani, M., Gallagher, P.G.,* Speicher, D.W., The common hereditary elliptocytosis-associated α-spectrin L260P mutation perturbs erythrocyte membranes by stabilizing spectrin in the closed dimer conformation. *Blood* 2013, 122, 3045–3053.

264. *Reid, M. E., Mohandas, N.,* Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin. Hematol.* 2004, 41, 93–117.

265. *Niss, O., Chonat, S., Dagaonkar, N., Almansoori, M.O., Kerr, K., Rogers, Z.R., McGann, P.T., Quarmyne, M.-O., Risinger, M., Zhang, K., Kalfa, T.A.,* Genotype-phenotype correlations in hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2016, 61, 4–9.

266. *King, M.J., Telfer, P., MacKinnon, H., Langabeer, L., McMahon, C., Darbyshire, P., Dhermy, D.,* Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytom. Part B – Clin. Cytom.* 2008, 74, 244–250.

267. *Mohandas, N., Gallagher, P.G.,* Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008, 112, 3939–3948.

268. *Bruce, L.J., Ring, S.M., Ridgwell, K., Reardon, D.M., Seymour, C.A., Van Dort, H.M., Low, P.S., Tanner, M.J. A.,* South-east Asian ovalocytic (SAO) erythrocytes have a cold sensitive cation leak: Implications for in vitro studies on stored SAO red cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1999, 1416, 258–270.

269. *Picard, V., Proust, A., Eveillard, M., Flatt, J.F., Couec, M.L., Caillaux, G., Fénéant-Thibault, M., Finkelstein, A., Raphaël, M., Delaunay, J., Bruce, L. J., Pissard, S., Thomas, C.,* Homozygous Southeast Asian ovalocytosis is a severe dyserythropoietic anemia associated with distal renal tubular acidosis. *Blood* 2014, 123, 1963–1965.

270. *Caulier, A., Jankovsky, N., Demont, Y., Ouled-Haddou, H., Demagny, J., Guitton, C., Merlusca, L., Lebon, D., Vong, P., Aubry, A., Lahary, A., Rose, C., Gréaume, S., Cardon, E., Platon, J., Ouadid-Ahidouch, H., Rochette, J., Marolleau, J. P., Picard, V., Garçon, L.,* PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica* 2020, 105, 610–622.

271. *Jankovsky, N., Caulier, A., Demagny, J., Guitton, C., Djordjevic, S., Lebon, D., Ouled-Haddou, H., Picard, V., Garçon, L.,* Recent advances in the pathophysiology of PIEZO1-related hereditary xerocytosis. *Am. J. Hematol.* 2021, 96, 1017–1026.

272. *Fermo, E., Bogdanova, A., Petkova-Kirova, P., Zaninoni, A., Marcello, A.P., Makhro, A., Hänggi, P., Hertz, L., Danielczok, J., Vercellati, C., Mirra, N., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W., Kaestner, L., Bianchi, P.,* «Gardos Channelopathy»: A variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1744.

273. *Glogowska, E., Lezon-Geyda, K., Maksimova, Y., Schulz, V.P., Gallagher, P.G.,* Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 2015, 126, 1281–1284.

274. *Kaufman, H.W., Niles, J.K., Gallagher, D.R., Rivera, A.l., Alper, S.L., Brugnara, C., Snyder, L.M.,* Revised prevalence estimate of possible hereditary xerocytosis as derived from a large U.S. Laboratory database. *Am. J. Hematol.* 2018, 93, E9–E12.

275. *Saotome, K., Murthy, S.E., Kefauver, J.M., Whitwam, T., Patapoutian, A., Ward, A.B.,* Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature* 2018, 554, 481–486.

276. *Dyrda, A., Cytlak, U., Ciuraszkiewicz, A., Lipinska, A., Cueff, A., Bouyer, G., Egée, S., Bennekou, P., Lew, V. L., Thomas, S.L.Y.,* Local membrane deformations activate Ca2+-dependent K+ and anionic currents in intact human red blood cells. *PLoS One* 2010, 5, e9447.

277. *Lin, Y.-C., Guo, Y. R., Miyagi, A., Levring, J., MacKinnon, R., Scheuring, S.,* Force-induced conformational changes in PIEZO1. *Nature* 2019, 573, 230–234.

278. *Picard, V., Guitton, C., Thuret, I., Rose, C., Bendelac, L., Ghazal, K., Aguilar-Martinez, P., Badens, C., Barro, C., Bénéteau, C., Berger, C., Cathébras, P., Deconinck, E., Delaunay, J., Durand, J. M., Firah, N., Galactéros, F., Godeau, B., Jaïs, X., de Jaureguiberry, J. P., Le Stradic, C., Lifermann, F., Maffre, R., Morin, G., Perrin, J., Proulle, V., Ruivard, M., Toutain, F., Lahary, A., Garçon, L.,* Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and gardos channelopathy: A retrospective series of 126 patients. *Haematologica* 2019, 104, 1554–1564.

279. *Risinger, M., Black, V., Hsieh, L., Prins, R.C., Menell, J., Badawi, M., Rutherford, C., Bride, K. L., Niss, O., Quinn, C. T., Giger Seu, K., Zhang, W., Kalfa, T.A.,* Evaluation of phenotype-genotype correlation in two common PIEZO1 mutations p.R2456H and p.L2495_E2495dup. *Blood* 2018, 132, 1040.

280. *Risinger, M., Glogowska, E., Chonat, S., Zhang, K., Dagaonkar, N., Joiner, C.H.,* Quinn, C.T., Kalfa, T.A., Gallagher, P.G., Hereditary xerocytosis: diagnostic considerations. *Am. J. Hematol.* 2018, 93, E67–E69.

281. *Maher, A.D., Kuchel, P.W.,* The Gárdos channel: a review of the Ca2+-activated K+ channel in human erythrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003, 35, 1182–1197.

282. *Rivera, A., Vandorpe, D.H., Shmukler, B.E., Andolfo, I., Iolascon, A., Archer, N.M., Shabani, E., Auerbach, M., Hamerschlak, N., Morton, J., Wohlgemuth, J.G., Brugnara, C., Snyder, L.M., Alper, S.L.,* Erythrocyte ion content and dehydration modulate maximal Gardos channel activity in KCNN4 V282M/+ hereditary xerocytosis red cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019, 317, C287–C302.

283. *Stewart, G.W., Amess, J.A., Eber, S.W., Kingswood, C., Lane, P.A., Smith, B.D., Mentzer, W.C.,* Thrombo-embolic disease after splenectomy for hereditary stomatocytosis. *Br. J. Haematol.* 1996, 93, 303–310.

284. *Rapetti-Mauss, R., Picard, V., Guitton, C., Ghazal, K., Proulle, V., Badens, C., Soriani, O., Garçon, L., Guizouarn, H.,* Red blood cell Gardos channel (KCNN4): the essential determinant of erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis. *Haematologica* 2017, 102, e415–e418.

285. *Ataga, K. I., Reid, M., Ballas, S.K., Yasin, Z., Bigelow, C., James, L. St., Smith, W.R., Galacteros, F., Kutlar, A., Hull, J.H., Stocker, J.W.,* Investigators, for the I.-17043-10 S., Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the gardos channel blocker senicapo. *Br. J. Haematol.* 2011, 153, 92–104.

286. *Bruce, L.J.,* Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells--recent developments. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2009, 42, 216–222.

287. *Westhoff, C.M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.-O. D., Foskett, J. K.,* Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 12499–12502.

288. *Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., Iolascon, A.,* Hereditary stomatocytosis: An underdiagnosed condition. *Am. J. Hematol.* 2018, 93, 107–121.

289. *Darghouth, D., Koehl, B., Heilier, J.F., Madalinski, G., Bovee, P., Bosman, G., Delaunay, J., Junot, C., Roméo, P. H.,* Alterations of red blood cell metabolome in overhydrated hereditary stomatocytosis. *Haematologica* 2011, 96, 1861–1865.

290. *Bawazir, W.M., Gevers, E.F., Flatt, J.F., Ang, A.L., Jacobs, B., Oren, C., Grunewald, S., Dattani, M., Bruce, L.J., Stewart, G.W.,* An infant with pseudohyperkalemia, hemolysis, and seizures: cation-leaky GLUT1-deficiency syndrome due to a SLC2A1 mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012, 97, E987–93.

291. *Achille Iolascon, Luigia De Falco, Franck Borgese, Maria Rosaria Esposito, Rosa Anna Avvisati, Pietro Izzo, Carmelo Piscopo, Helene Guizouarn, Andrea Biondani, Antonella Pantaleo, Lucia De Franceschi,* A novel erythroid anion exchange variant (Gly796Arg) of hereditary stomatocytosis associated with dyserythropoiesis. *Haematologica* 2009, 94, 1049–1059.

292. *Avent, N.D., Reid, M.E.,* The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000, 95, 375–387.

293. *Cartron, J.P.,* RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 1999, 12, 655–689.

294. Sturgeon, P., Hematological observations on the anemia associated with blood type Rhnull. *Blood* 1970, 36, 310–320.

295. *Nash, R., Shojania, A.M.,* Hematological aspect of Rh deficiency syndrome: a case report and a review of the literature. *Am. J. Hematol.* 1987, 24, 267–275.

296. *Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., Mohandas, N.,* Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2016, 56, 9–22.

297. *Ouellette, R.J., Rawn, J.D., in: Ouellette, R.J., Rawn, J. D. B. T.-O. C. (Second E. (Eds.),* Organic Chemistry (Second Edition). Academic Press 2018, pp. 929–971.

298. *GREENWOOD, N.N.,* EARNSHAW, A.B.T.-C. of the E. (Second E. (Eds.), Butterworth-Heinemann, Oxford 1997, pp. 1070–1112.

299. *Sankaran, V.G., Orkin, S.H.,* The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013, 3, a011643.

300. *Modell, B., Darlison, M.,* Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull. World Health Organ.* 2008, 86, 480–487.

301. *Karamperis, K., Tsoumpeli, M.T., Kounelis, F., Koromina, M., Mitropoulou, C., Moutinho, C., Patrinos, G.P.,* Genome-based therapeutic interventions for β-type hemoglobinopathies. *Hum. Genomics* 2021, 15, 32.

302. *Kountouris, P., Lederer, C.W., Fanis, P., Feleki, X., Old, J., Kleanthous, M.,* IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PLoS One* 2014, 9, e103020.

303. *Harteveld, C.L., Achour, A., Arkesteijn, S.J.G., ter Huurne, J., Verschuren, M.,* Bhagwandien-Bisoen, S., Schaap, R., Vijfhuizen, L., el Idrissi, H., Koopmann, T.T., The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022, 44, 28–36.

304. *Kato, G.J., Piel, F.B., Reid, C.D., Gaston, M.H., Ohene-frempong, K., Krishnamurti, L., Smith, W. R., Panepinto, J.A., Weatherall, D.J., Costa, F.F., Vichinsky, E.P.,* Sickle cell disease. *Nat. Publ. Gr.* 2018, 4, 1–22.

305. *Williams, T.N., Thein, S.L.*, Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2018, 19, 113–147.

306. *Brugnara, C., de Franceschi, L., Alper, S. L.,* Inhibition of Ca(2+)-dependent K+ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J. Clin. Invest.* 1993, 92, 520–526.

307. *Steinberg, M. H.,* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 2020, 136, 2392–2400.

308. *Steinberg, M.H., Chui, D. H. K., Dover, G. J., Sebastiani, P., Alsultan, A.,* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood* 2014, 123, 481–485.

309. *Gualandro, S.F.M., Fonseca, G.H.H., Yokomizo, I. K., Gualandro, D. M., Suganuma, L. M.,* Cohort study of adult patients with haemoglobin SC disease: clinical characteristics and predictors of mortality. *Br. J. Haematol.* 2015, 171, 631–637.

310. *Figueiredo, M.S.,* The compound state: Hb S/beta-thalassemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015, 37, 150–152.

311. *Borg, J., Phylactides, M., Bartsakoulia, M., Tafrali, C., Lederer, C., Felice, A.E., Papachatzopoulou, A., Kourakli, A., Stavrou, E. F., Christou, S., Hou, J., Karkabouna, S., Lappa-Manakou, C., Ozgur, Z., van Ijcken, W., von Lindern, M., Grosveld, F. G., Georgitsi, M., Kleanthous, M., Philipsen, S., Patrinos, G. P.,* KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in β-hemoglobinopathy patients. *Pharmacogenomics* 2012, 13, 1487–1500.

312. *Kolliopoulou, A., Siamoglou, S., John, A., Sgourou, A., Kourakli, A., Symeonidis, A., Vlachaki, E., Chalkia, P., Theodoridou, S., Ali, B. R., Katsila, T., Patrinos, G. P.,* Papachatzopoulou, A., Role of genomic biomarkers in increasing fetal hemoglobin levels upon hydroxyurea therapy and in β-thalassemia intermedia: a validation cohort study. *Hemoglobin* 2019, 43, 27–33.

313. *Brandow, A. M., Liem, R. I.,* Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J. Hematol. Oncol.* 2022, 15, 20.

314. *Oringanje C, N. E., Oniyangi, O.,* Hematopoietic stem cell transplantation for people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016, DOI: 10.1002/14651858.CD007001.pub4.

315. *Ribeil, J.-A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J.-F., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R. W., Negre, O., Veres, G., Sandler, L., Soni, S., de Montalembert, M., Blanche, S., Leboulch, P., Cavazzana, M.,* Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 2017, 376, 848–855.

316. *Ali, S., Mumtaz, S., Shakir, H.A., Khan, M., Tahir, H.M., Mumtaz, S., Mughal, T.A., Hassan, A., Kazmi, S. A. R., Sadia, Irfan, M., Khan, M.A.,* Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol. Genet. genomic Med.* 2021, 9, e1788.

317. Galanello, R., Cao, A., Alpha-thalassemia. *Genet. Med.* 2011, 13, 83–88.

318. *Farashi, S., Harteveld, C.L.,* Molecular basis of α-thalassemia. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2018, 70, 43–53.

319. *Origa, R., in: Adam, M.P., Everman, D.B., Mirzaa, G.M., Pagon, R. A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H., Gripp, K.W., Amemiya, A. (Eds.)*, GeneReviewsInternet]. University of Washington, Seattle (WA), Seattle (WA) 2000.

320. *Taher, A.T., Musallam, K.M., Cappellini, M.D., Weatherall, D.J.,* Optimal management of β thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.* 2011, 152, 512–523.

321. *Henni, T., Belhani, M., Morle, F., Bachir, D., Tabone, P., Colonna, P., Godet, J.,* Alpha globin gene triplication in severe heterozygous beta thalassemia. *Acta Haematol.* 1985, 74, 236–239.

322. *Harteveld, C.L., Refaldi, C., Giambona, A., Ruivenkamp, C.A.L.,* Hoffer, M.J.V, Pijpe, J., De Knijff, P., Borgna-Pignatti, C., Maggio, A., Cappellini, M.D., Giordano, P.C., Mosaic segmental uniparental isodisomy and progressive clonal selection: a common mechanism of late onset β-thalassemia major. *Haematologica* 2013, 98, 691–695.

323. Achour, A., Koopmann, T., Castel, R., Santen, G.W.E., den Hollander, N., Knijnenburg, J., Ruivenkamp, C.A.L., Arkesteijn, S.G.J., Ter Huurne, J., Bisoen, S., Verschuren, M., Vijfhuizen, L., Schaap, R., Grimbergen, A., Slomp, J., Traeger-Synodinos, J., Vrettou, C., Pissard, S., Galacteros, F., Baas, F., Harteveld, C. L., A new gene associated with a β-thalassemia phenotype: the observation of variants in SUPT5H. *Blood* 2020, 136, 1789–1793.

324. *Canatan, D., Koç, N.,* The effect of transfusion on pulmonary function tests in patients with thalassemia. *Turkish J. Haematol. Off. J. Turkish Soc. Haematol.* 2004, 21, 137–139.

325. *Kwiatkowski, J.L., Thompson, A.A., Rasko, J.E.J., Hongeng, S., Schiller, G.J., Anurathapan, U., Cavazzana, M., Ho, P.J., Schmidt, M., Kletzel, M., Vichinsky, E.P., Deary, B., Chen, Y., Petrusich, A., Walters, M.C.,* Long-term clinical outcomes of lentiglobin gene therapy for transfusion-dependent β-thalassemia in the northstar (HGB-204) study. *Blood* 2019, 134, 4628.

326. Thompson, A.A., Walters, M.C., Kwiatkowski, J., Rasko, J.E.J., Ribeil, J.-A., Hongeng, S., Magrin, E., Schiller, G. J., Payen, E., Semeraro, M., Moshous, D., Lefrere, F., Puy, H., Bourget, P., Magnani, A., Caccavelli, L., Diana, J.-S., Suarez, F., Monpoux, F., Brousse, V., Poirot, C., Brouzes, C., Meritet, J.-F., Pondarré, C., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Teachey, D.T., Anurathapan, U., Ho, P. J., von Kalle, C., Kletzel, M., Vichinsky, E., Soni, S., Veres, G., Negre, O., Ross, R. W., Davidson, D., Petrusich, A., Sandler, L., Asmal, M., Hermine, O., De Montalembert, M., Hacein-Bey-Abina, S., Blanche, S., Leboulch, P., Cavazzana, M., Gene therapy in patients with transfusion-dependent β-thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, 1479–1493.

327. *Kunz, J.B., Kulozik, A. E.,* Gene Therapy of the Hemoglobinopathies. *HemaSphere* 2020, 4, e479.

328. Полина Лосева. Самым дорогим лекарством в мире стала новая терапия бета-талассемии. Один укол стоит 2,8 миллиона долларов.

329. *Frewin, R., in: Marshall, W. J., Lapsley, M., Day, A. P., Ayling, R. M. B. T.-C. B. M. and C. A.* (Third E. (Eds.). Churchill Livingstone 2014, pp. 515–532.

330. Čermák, J., Písačka, M., Autoimmune hemolytic anemia. *Vnitr. Lek.* 2018, 64, 514–519.

331. *Barcellini, W.,* New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus. Med. hemotherapy Off. Organ der Dtsch. Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2015, 42, 287–293.

332. *Berentsen, S.,* How I manage cold agglutinin disease. *Br. J. Haematol.* 2011, 153, 309–317.

333. *Garratty, G., Arndt, P.A.,* Drugs that have been shown to cause drug-induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* 2014, 30, 66–79.

334. *Swiecicki, P.L., Hegerova, L.T., Gertz, M.A.,* Cold agglutinin disease. *Blood* 2013, 122, 1114–1121.

335. *Berentsen, S., Ulvestad, E., Langholm, R., Beiske, K., Hjorth-Hansen, H., Ghanima, W., Sørbø, J.H., Tjønnfjord, G.E.,* Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica* 2006, 91, 460–466.

336. *Fattizzo, B., Zaninoni, A., Nesa, F., Sciumbata, V. M., Zanella, A., Cortelezzi, A., Barcellini, W.,* Lessons from very severe, refractory, and fatal primary autoimmune hemolytic anemias. *Am. J. Hematol.* 2015, 90, E149-51.

337. *Bartolmäs, T., Salama, A.,* A dual antiglobulin test for the detection of weak or nonagglutinating immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion* 2010, 50, 1131–1134.

338. *Jäger, U., Barcellini, W., Broome, C.M., Gertz, M.A., Hill, A., Hill, Q.A., Jilma, B., Kuter, D.J., Michel, M., Montillo, M., Röth, A., Zeerleder, S.S., Berentsen, S.,* Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Rev.* 2019, 41, 100648.

339. *Randen, U., Trøen, G., Tierens, A., Steen, C., Warsame, A., Beiske, K., Tjønnfjord, G.E., Berentsen, S., Delabie, J.,* Primary cold agglutinin-associated lymphoproliferative disease: a B-cell lymphoma of the bone marrow distinct from lymphoplasmacytic lymphoma. *Haematologica* 2014, 99, 497–504.

340. *Treon, S.P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Sheehy, P., Manning, R.J., Patterson, C.J., Tripsas, C., Arcaini, L., Pinkus, G.S., Rodig, S.J., Sohani, A.R., Harris, N.L., Laramie, J.M., Skifter, D.A., Lincoln, S.E., Hunter, Z. R.,* MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367, 826–833.

341. *Schwartz, J., Padmanabhan, A., Aqui, N., Balogun, R.A., Connelly-Smith, L., Delaney, M., Dunbar, N.M., Witt, V., Wu, Y., Shaz, B.H.,* Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the writing committee of the american society for apheresis: the seventh special issue. *J. Clin. Apher.* 2016, 31, 149–162.

342. *Fattizzo, B., Barcellini, W.,* Autoimmune hemolytic anemia: causes and consequences. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2022, 18, 731–745.

343. *Röth, A., Barcellini, W., D'Sa, S., Miyakawa, Y., Broome, C.M., Michel, M., Kuter, D.J., Jilma, B., Tvedt, T.H.A., Lin, S., Jiang, X., Reuter, C., Hobbs, W., Berentsen, S.,* Inhibition of Complement C1s with Sutimlimab in Patients with Cold Agglutinin Disease (CAD): Results from the Phase 3 Cardinal Study. *Blood* 2019, 134, LBA-2.

344. *Jäger, U., D'Sa, S., Schörgenhofer, C., Bartko, J., Derhaschnig, U., Sillaber, C., Jilma-Stohlawetz, P., Fillitz, M., Schenk, T., Patou, G., Panicker, S., Parry, G.C., Gilbert, J.C., Jilma, B.,* Inhibition of complement C1s improves severe hemolytic anemia in cold agglutinin disease: a first-in-human trial. *Blood* 2019, 133, 893–901.

345. *Arndt, P.A., Garratty, G.,* The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic anemia. *Semin. Hematol.* 2005, 42, 137–144.

346. *Garratty, G.,* Immune hemolytic anemia caused by drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* 2012, 11, 635–642.

347. *Solheim, B.G., Grönn, M.,* Hansen, T.W.R., Hemolytic disease of the fetus and newborn. *Ross. Princ. Transfus. Med.* 2016, 11, 528–534.

348. *Krista, L., Hillyer, in: Hillyer, C. D., Strauss, R. G., Luban, N.L.C.B. T.-H. of P.T.M. (Eds.),* Handbook of Pediatric Transfusion. Academic Press, San Diego 2004, pp. 209–220.

349. *Tsai, H.M.,* Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier 2014, pp. 329–332.

350. *Yoshida, M., Suzuki, H., Hamaguchi, S., Iwasaki, M., Fukuda, H., Takahara, H., Tomita, S., Suzuki, Y.,* March hemoglobinuria progressed to acute kidney injury after kendo practice: a case report. *BMC Nephrol.* 2022, 23, 368.

351. *Cannata, A., Cantoni, S., Sciortino, A., Bruschi, G., Russo, C.F.,* Mechanical hemolysis complicating transcatheter interventions for valvular heart disease: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2021, 77, 2323–2334.

352. *Blackshear, P.L., in: Y.C. Fung, N. Perrone, and M.A. (Ed.),* Biomechanics: Its Foundation and Objectives. Prentice-Hall, NJ 1972, pp. 501–528.

353. *Woo, Y.-R., Yoganathan, A.P.,* In vitro pulsatile flow velocity and shear stress measurements in the vicinity of mechanical mitral heart valve prostheses. *J. Biomech.* 1986, 19, 39–51.

354. *Grigioni, M., Caprari, P., Tarzia, A.,* D'Avenio, G., Prosthetic heart valves' mechanical loading of red blood cells in patients with hereditary membrane defects. *J. Biomech.* 2005, 38, 1557–1565.

355. *Caprari, P., Tarzia, A., Mojoli, G., Cianciulli, P., Mannella, E., Martorana, M.C.,* Hereditary spherocytosis and elliptocytosis associated with prosthetic heart valve replacement: rheological study of erythrocyte modifications. *Int. J. Hematol.* 2009, 89, 285–293.

356. *Skoularigis, J., Essop, M. R., Skudicky, D., Middlemost, S. J., Sareli, P.*, Frequency and severity of intravascular hemolysis after left-sided cardiac valve replacement with medtronic hall and St. Jude medical prostheses, and influence of prosthetic type, position, size and number. *Am. J. Cardiol.* 1993, 71, 587–591.

357. *Mecozzi, G., Milano, A.D., De Carlo, M., Sorrentino, F., Pratali, S., Nardi, C., Bortolotti, U.,* Intravascular hemolysis in patients with new-generation prosthetic heart valves: a prospective study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002, 123, 550–556.

358. *Shapira, Y., Vaturi, M., Sagie, A.,* Hemolysis associated with prosthetic heart valves: a review. *Cardiol. Rev.* 2009, 17, 121–124.

359. *Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., Kinoshita,* T., Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73, 703–711.

360. *Bessler, M., Mason, P.J., Hillmen, P., Miyata, T., Yamada, N., Takeda, J., Luzzatto, L., Kinoshita, T.,* Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG–A gene. *EMBO J.* 1994, 13, 110–117.

361. *Shah N, B. H.,* Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562292/%0A.

362. *Schrezenmeier, H., Röth, A., Araten, D.J., Kanakura, Y., Larratt, L., Shammo, J.M., Wilson, A., Shayan, G., Maciejewski, J.P.,* Baseline clinical characteristics and disease burden in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): updated analysis from the International PNH Registry. *Ann. Hematol.* 2020, 99, 1505–1514.

363. *Mukhina, G.L., Buckley, J.T., Barber, J.P., Jones, R.J., Brodsky, R.A.,* Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 2001, 115, 476–482.

364. *Hill, A., Kelly, R.J., Hillmen, P.,* Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013, 121, 4985–96; quiz 5105.

365. *Parker, C., Omine, M., Richards, S., Nishimura, J., Bessler, M., Ware, R., Hillmen, P., Luzzatto, L., Young, N., Kinoshita, T.,* Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005, 106, 3699–3709.

366. *Wong, R.S.M.,* Safety and efficacy of pegcetacoplan in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ther. Adv. Hematol.* 2022, 13, 20406207221114670.

367. *Farrell, P.M., Bieri, J.G., Fratantoni, J.F., Wood, R.E., di Sant'Agnese, P. A.,* The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1977, 60, 233–241.

368. *Wilfond, B.S., Farrell, P.M., Laxova, A., Mischler, E.,* Severe hemolytic anemia associated with vitamin E deficiency in infants with cystic fibrosis. Implications for neonatal screening. *Clin. Pediatr. (Phila).* 1994, 33, 2–7.

369. *Laurens, M.B.,* RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020, 16, 480–489.

370. *Haldar, K., Mohandas, N.,* Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2009, 87–93.

371. Organization, W.H., World Malaria Report 2022. World Health Organization 2022.

372. *White, N. J.,* Anaemia and malaria. *Malar. J.* 2018, 17, 371.

373. *Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A., Lee, S.H., Karbwang, J., Warrell, M. J., White, N. J., Swasdichai, C., Weatherall, D. J.,* The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *QJM An Int. J. Med.* 1986, 58, 305–323.

374. *Looareesuwan, S., Davis, T.M.E., Pukrittayakamee, S., Supanaranond, W., Desakorn, V., Silamut, K., Krishna, S., Boonamrung, S., White, N.J.,* Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Trop.* 1991, 48, 263–270.

375. *Dondorp, A.M., Angus, B.J., Chotivanich, K., Silamut, K., Ruangveerayuth, R., Hardeman, M.R., Kager, P.A., Vreeken, J., White, N.J.,* Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 60, 733–737.

376. *Griffiths, M.J., Ndungu, F., Baird, K.L., Muller, D.P.R., Marsh, K., Newton,* C.R.J.C., Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Br. J. Haematol.* 2001, 113, 486–491.

377. *Joshi, P., Alam, A., Chandra, R., Puri, S.K., Gupta, C.M.,* Possible basis for membrane changes in nonparasitized erythrocytes of malaria-infected animals. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1986, 862, 220–222.

378. *Duez, J., Holleran, J.P., Ndour, P.A., Pionneau, C., Diakité, S., Roussel, C.,* Dussiot, M., Amireault, P., Avery, V.M., Buffet, P.A., Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. *Transfus. Clin. Biol.* 2015, 22, 151–157.

379. *Skorokhod, O.A., Caione, L., Marrocco, T., Migliardi, G., Barrera, V., Arese, P., Piacibello, W., Schwarzer, E.,* Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* 2010, 116, 4328–4337.

380. *Angus, B.J., Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., White, N.J.,* In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* 1997, 90, 2037–2040.

381. *Newton, P.N., Chotivanich, K., Chierakul, W., Ruangveerayuth, R., Teerapong, P., Silamut, K., Looareesuwan, S., White, N. J.,* A comparison of the in vivo kinetics of Plasmodium falciparum ring–infected erythrocyte surface antigen–positive and–negative erythrocytes. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* 2001, 98, 450–457.

382. *Ndour, P.A., Larréché, S., Mouri, O., Argy, N., Gay, F., Roussel, C., Jauréguiberry, S., Perillaud, C., Langui, D., Biligui, S.,* Measuring the Plasmodium falciparum HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis. *Sci. Transl. Med.* 2017, 9, eaaf9377.

383. *Imwong, M., Nguyen, T. N., Tripura, R., Peto, T.J., Lee, S.J., Lwin, K.M., Suangkanarat, P., Jeeyapant, A., Vihokhern, B., Wongsaen, K.,* The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malar. J.* 2015, 14, 1–13.

384. *Kenangalem, E., Karyana, M., Burdarm, L., Yeung, S., Simpson, J.A., Tjitra, E., Anstey, N. M., Poespoprodjo, J.R., Price, R.N., Douglas, N.M.,* Plasmodium vivax infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar. J.* 2016, 15, 1–10.

385. *Braunstein, E.M.*, Anemia of Chronic Disease, https://www.msdmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/anemias-caused-by-deficient-erythropoiesis/anemia-of-chronic-disease.

Глава 6. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Алиев М.Д., Миронов С.П., Мусаев Э.Р., Феденко А.А.

Физиология соединительной ткани

Соединительная ткань является наиболее распространенной и разнообразной в животном мире. Выделяют 4 основных группы тканей: эпителиальная, мышечная, нервная и соединительная. Последняя отвечает за обеспечение структуры, поддержки и защиты тела человека [105].

Клеточность

Соединительная ткань объединяет в себе различные типы тканей, включая рыхлую и плотную волокнистые соединительные ткани, жировую ткань, хрящевую и костную ткани и кровь. При этом, несмотря на разнообразие соединительных тканей, все они состоят из трех основных компонентов: основного вещества, волокон и клеток.

Основное вещество и волокна образуют внеклеточный матрикс, который является структурным каркасом всех окружающих тканей организма человека. Состав внеклеточного матрикса значительно варьирует от органа к органу, что приводит к большому разнообразию типов соединительной ткани [83].

Основное вещество представляет собой аморфный желатиноподобный материал с большим содержанием жидкости и располагается между клетками и волокнами. Состоит оно преимущественно из гликозаминогликанов, в частности гиалуроновой кислоты, протеогликанов и белков клеточной адгезии, таких как ламинин и фибронектин, выполняющих связующую функцию клеток во внеклеточном матриксе. Основной функцией основного вещества является обеспечение обмена нутриентами между капиллярами и клетками [272].

Волокна являются еще одним важным компонентом внеклеточного матрикса соединительной ткани. Выделяют три основных типа волокон, которые представлены во всех типах соединительной ткани. Количество каждого типа отражает функцию и характеристику конкретного типа ткани. Коллагеновые волокна – большие, мощные волокна – представлены наиболее часто коллагеном I типа, который обеспечивает большой запас прочности внеклеточному матриксу, в рыхлой и плотной волокнистых соединительных тканях [105].

- **Ретикулярные волокна:** нежные, тонкие волокна представлены коллагеном III типа, который, перекрещиваясь, формирует поддерживающую сеть ретикулярной пластины основной мембраны печени, костного мозга, селезенки, и лимфатических узлов [86].

- **Эластические волокна:** тонкие, ветвящиеся волокна, представленные эластином, который обеспечивает растяжение и сжатие внеклеточного матрикса. Этот тип волокон представлен в легких, аорте, коже и голосовых складках [246].

Для дальнейшего понимания клинической физиологии соединительной ткани необходимо отметить наличие различных типов коллагена, которые образуют волокна внеклеточного матрикса. Коллаген – наиболее распространенный белок человеческого организма, в настоящее время выделяют 28 его подтипов [199]. Ниже представлены 4 наиболее часто встречающихся.

- **Тип I –** наиболее распространенный тип: гибкий, прочный, обеспечивает устойчивость к силе, натяжению и растяжению; встречается во всех соединительных тканях, в частности в рубцовой ткани, сухожилиях, связках, кости, роговице, коже и дентине.
- **Тип II** обеспечивает устойчивость к давлению, представлен в суставных и гиалиновых хрящах суставов и межпозвоночных дисках.
- **Тип III** обеспечивает гибкую сетчатую структуру для поддержки клеток, основного компонента ретикулярных волокон, часто встречающихся в таких органах, как кожа и кровеносные сосуды. Также в изобилии присутствует на ранних стадиях заживления ран и играет важную роль в формировании грануляционной ткани [64].
- **Тип IV –** сетчатая структура, обеспечивающая поддержку и прикрепление к нижележащему внеклеточному матриксу, образует базальную пластину базальной мембраны, важнейшего компонента почек, внутреннего уха и хрусталика глаза.

Клеточный состав соединительной ткани наиболее часто представлен фибробластами, макрофагами, адипоцитами, лейкоцитами и тучными клетками [156].

Синтез коллагена и структура

Синтез коллагена начинается с трансляции ДНК полипептидной цепи в эндоплазматическом ретикулуме внутриклеточного пространства. Эта полипептидная цепь известна как препроколлаген, состоящий из альфа-цепей с повторяющимися аминокислотными последовательностями глицин-X-Y (X и Y представляют собой пролин или лизин) [187].

Альфа-цепи пролина и лизина гидроксилируются с помощью витамин С-зависимых гидроксилаз. Гидроксилирование помогает сформировать стабильную структуру. Дефицит витамина С приводит к нарушению гидроксилирования препроколлагена и дефектному синтезу коллагена, к заболеванию, известному как цинга [141].

Затем гидроксилированный лизин альфа-цепей подвергается гликозилированию с добавлением углевода. После гликозилирования дисульфидные и водородные связи между тремя различными альфа-цепями образуют тройную спираль – проколлаген. Дефектное формирование тройной спирали приводит к несовершенному остеогенезу и нарушению синтеза костного матрикса [148].

Затем проколлаген проникает во внеклеточное пространство посредством экзоцитоза. Попав во внеклеточное пространство, проколлаген расщепляется на С-конце и N-конце, образуя то, что сейчас называется тропоколлагеном. Тропоколлаген нерастворим в воде в результате расщепления.

Затем тропоколлаген усиливается многими соседними молекулами тропоколлагена путем ковалентного сшивания гидроксилированных остатков лизина, в результате чего образуются коллагеновые фибриллы. Сшивание остатков гидроксилизина происходит благодаря медь-зависимому ферменту – лизилоксидазе.

Далее несколько коллагеновых фибрилл образуют толстый пучок, который называется коллагеновым волокном [120].

Эмбриогенез

Соединительная ткань в основном происходит из мезенхимы, которая берет свое начало из мезодермы. Однако в состав некоторых костей лица и черепа также входят клетки нервного гребня, которые происходят из эктодермы [175].

Функции соединительной ткани

Соединительная ткань выполняет множество различных функций в зависимости от ее классификации [212]. Таким образом, соединительная ткань обеспечивает:

- устойчивость к растяжению и разрыву;
- структурную поддержку;
- изоляцию от внешней среды и между компартментами;
- функцию третьего пространства для хранения жидкостей;
- пространство для межклеточного обмена.

Клиническая физиология

Существует более 200 заболеваний соединительной ткани [77]. Основные факторы, влияющие на нарушения функции соединительной ткани, в зависимости от этиологии условно можно разделить на четыре группы: экзогенные факторы воздействия внешней среды – травма и инфекционное воспаление; аутоиммуные процессы; процессы, вызванные генетическими аберрациями, и канцерогенез [1,2,3,4].

Клиническая физиология крови – как соединительной ткани – рассмотрена в отдельной главе книги (Ф. Атауллаханов и соавт.).

Травма и воспаление относятся к процессам внешней среды и практически всегда они физиологически обратимы, но существуют ситуации, когда при политравме или высокой инфекционной агрессии физиологический процесс выходит из-под контроля адаптационных систем организма. (Миронов С.П., 2009 г.).

Одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний соединительной ткани является ревматоидный артрит. Ревматоидный артрит (РА) – это хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся

аутоиммунным разрушением хрящей и костей. Классическая модель пациента – женщина среднего возраста с симметричной болью и припухлостью пястно-фаланговых суставов и проксимальных межфаланговых суставов при отсутствии поражения дистальных межфаланговых суставов. Также РА может проявляться в виде незначительной лихорадки, миалгий, недомогания, ночной потливости и может поражать различные органы тела человека [88].

Редким, но интересным наследственным заболеванием соединительной ткани является несовершенный остеогенез, также известный как болезнь хрупких костей или мраморная болезнь. Это является результатом аутосомно-доминантной мутации, приводящей к дефектному синтезу коллагена I типа и нарушению формирования костного матрикса. Клинически заболевание проявляется в виде повторяющихся переломов (особенно длинных костей или ребер) с минимальной травмой у детей, что часто ошибочно принимается за жестокое обращение с детьми. Некоторые другие проявления включают посинение склер, прогрессирующую потерю слуха и хрупкие, опалесцирующие зубы [250]. Другим примером наследственного заболевания соединительной ткани является синдром Альпорта. Синдром Альпорта обычно является Х-сцепленным доминантным нарушением, приводящим к генетическому дефекту коллагена IV типа, что приводит к характерному расщеплению базальной мембраны клубочков, особенно в почках. Это состояние обычно проявляется у мальчиков с гломерулоненефритом, нейросенсорной глухотой и глазными аномалиями, такими как ретинопатия и смещение хрусталика [108].

Одной из увлекательных областей исследований, которая может оказать значительное влияние в области ортопедии, является концепция тканевой инженерии. Биомедицинские инженеры и хирурги-ортопеды работают вместе над созданием новых стратегий восстановления поврежденных тканей. В настоящее время проводятся исследования с использованием мениска животного в качестве модели для изучения инженерной имплантируемой платформы, которая могла бы служить для заживления ран. Мениск, состоящий из плотной соединительной ткани, как правило, слишком плотный, чтобы позволить стволовым клеткам свободно перемещаться к месту повреждения и начать процесс восстановления. Разработан микроскопический каркас, который пропитан ферментом для разрыхления матрицы и факторами роста, для привлечения стволовых клеток. Когда исследователи поместили этот микроскопический каркас в поврежденную ткань мениска коровы, матрица разрыхлилась и позволила костным стволовым клеткам добраться до каркаса и начать процесс восстановления. На следующем этапе исследований предполагается рассмотреть модели на крупных животных и, в конечном счете, испытания на людях [137].

Аскорбиновая кислота (витамин С) необходима для активации фермента пролилгидроксилазы, который способствует стадии гидроксилирования при образовании гидроксипролина, неотъемлемой составляющей коллагена. Без аскорбиновой кислоты коллагеновые волокна, образующиеся практически во всех тканях организма, становятся дефектными и слабыми. Поэтому витамин С важен для роста и прочности волокон в подкожной клетчатке, хрящах, костях и зубах. В частности, дефицит аскорбиновой кислоты в течение примерно 20-30 недель может вызвать цингу. Одним из наиболее важных последствий цинги является незаживление ран [80].

Аутоиммунные процессы соединительной ткани. Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) считается хроническим системным, многофакторным, воспалительным и прогрессирующим аутоиммунным заболеванием, поражающим людей во всем мире.

РА поражает опорно-двигательный аппарат, повреждая суставы и приводя к локальному воспалению, разрушению хряща и эрозии кости, при этом течение заболевания у пациентов может значительно отличаться. Ранняя диагностика РА имеет решающее значение для предотвращения значительного повреждения суставов и развития инвалидности, а аутоантитела в качестве биомаркеров играют ключевую роль у пациентов с системным РА и могут помочь установить диагноз, определить прогноз и принять решение о тактике лечения.

Помимо аутоантител, в прогрессировании РА принимают участие и другие факторы, такие как эпигенетические изменения, посттрансляционные модификации, гликозилирование, аутофагия и Т-клетки. Понимание взаимосвязи между этими факторами будет способствовать более глубокому знанию о причинах, механизмах прогрессирования и лечения заболевания.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое воспалительное аутоиммунное состояние с дегенеративным поражением хряща и подлежащей кости, которое приводит к выраженному болевому синдрому и значительно ухудшает качество жизни у многих людей во всем мире [72]. Массивное повреждение суставов может быть предотвращено ранней диагностикой и, в свою очередь, может привести к улучшению отдаленных результатов. Большое количество исследований указывает на то, что значительное повреждение суставов может произойти в течение первых 2 лет после начала заболевания. Оптимальная терапия РА должна быть начата в течение первых 3-6 месяцев [55, 70]. Таким образом, для обеспечения ранней диагностики, точного прогноза и улучшения лечения заболевания необходимы надежные биомаркеры. Одной из наиболее значимых характеристик РА является понимание ключевой роли инфильтрации иммунных клеток в сустав с последующей эрозией кости. В отношении антигенов-мишеней многочисленные типы аутоантител были классифицированы как признаки ревматоидного артирита. Два из них – ревматоидный фактор (РФ) и антитела к цитруллинированному пептиду (АЦЦП) [222]. Кроме того, считается, что генетическая предрасположенность составляет от 50 до 60% влияния на уязвимость к РА. Гены человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) являются наиболее сильными предрасполагающими вариантами генов для развития РА в гене HLA класса II гистосовместимости антиген-DRB1-beta цепи (HLA-DRB1), консервативной аминокислотной последовательности, которая разделяется через множественные ассоциированные с РА аллели риска. Действительно, локус HLA был в основном связан с сероположительным РА и с повышенным уровнем

антител в сыворотке против цитруллинированных пептидов [229,251]. «Гипотеза общего эпитопа» в качестве возможной основы для всех заболеваний, включая полиморфизмы класса II HLA, которая была предложена Грегерсоном и соавторами в 1987 году, представляет собой ключевое событие и значительный прогресс в исследованиях РА. Некоторые аллели молекул HLA-DR1 и HLA-DR4 имеют общую аминокислотную последовательность (так называемый «общий эпитоп»), демонстрируя связь между патогенезом аутоиммунных заболеваний, таких как РА, и этими эпитопами [79]. Следует отметить, что патогенез РА имеет полигенную основу. Недавний прогресс в исследованиях геномных ассоциаций (GWAS) обогатил наши знания о генетической восприимчивости, лежащей в основе РА, введя более 100 генетических локусов, связанных с повышенным риском развития РА [229,251].

Другим вариантом при РА может быть мутация R620W в протеин-тирозин-фосфатазе, не рецептор типа 22 (PTPN22) (происходящая из 1858C→T -клеток) [63], кодирующая протеин-тирозин-фосфатазу, фермент, экспрессируемый в гемопоэтических клетках, который отрицательно регулирует передачу сигналов антигенового рецептора в B- и T-клетках [29]. Кроме того, сообщалось, что аллель R620W риска действует как вариант усиления функции [23], и передача сигналов как T-клеточного рецептора (TCR), так и B-клеточного рецептора (BCR) снижается в клетках, несущих этот аллель риска [201]. Как упоминалось ранее, присутствие аутоантител, таких как РФ и АЦЦП, является характерной особенностью РА. Они предшествуют началу проявлений заболевания и предсказывают прогрессирование до классического серопоположительного типа РА [55,7]. Именно поэтому предполагается, что они играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита. Поскольку РА является многофакторным заболеванием, его развитие может зависеть не только от генетических состояний, но и от серологических изменений, а также факторов окружающей среды. Много исследований было посвящено пониманию потенциального влияния конкретных факторов окружающей среды, таких как курение, периодонтит, специфические инфекции, отсутствие солнечного света или обработанные продукты [19, 78]. Кроме того, загрязнение воздуха также является весьма актуальной проблемой, поскольку перекрестное исследование недавно показало, что существует связь между сильным загрязнением воздуха, увеличением воспалительного параметра С-реактивного белка (CRP) и возникновением рецидивов РА [6]. Также считается, что определенное значение имеют метаболические изменения, так как у пациентов с РА обнаружена измененная провоспалительная бактериальная композиция орального [68], слюнного и кишечного микробиома [281]. Из-за изменений в метаболической системе больных РА, известных как липидный парадокс, необходимо внимательно следить за их сердечно-сосудистыми факторами [24].

Аутоантитела, участвующие в развитии РА

Аутоантитела, такие как РФ и АЦЦП, обычно определяют как сывороточные маркеры у пациентов с ревматоидным артритом. Поскольку треть пациентов с РА серонегативны, эти маркеры не могут рассматриваться как специфические, и использование этих параметров является спорным. Однако

стоит продолжить исследование аутоантител, поскольку в настоящее время было показано, что около трети серонегативных пациентов с РА образуют антитела, ассоциированные с РА, включая изотипы IgA РФ и АЦЦП, а также антител к антигену РА33 [222, 97].

В-клетки, агрегирующие в лимфоидных фолликулах и зародышевых центрообразных структурах воспаленного синовия при РА, продуцируют РФ-аутоантитела, которые взаимодействуют непосредственно с Fc-областью накопленного IgG. Кроме того, данные подтверждают патогенную сущность РФ и ее участие в патофизиологии РА. Низкоаффинный IgM РФ получают введением иммунных комплексов и поликлональных активаторов В-клеток, таких как липополисахариды бактерий и вируса Эпштейна-Барра (EBV) [97]. В патогенном процессе РА высокоаффинный РФ (в синовиальной жидкости суставов) участвует в воспалении и захвате антигена. Интересно, что РФ может локально индуцировать иммунные комплексы в синовиальных воспалительных участках, за которыми может следовать активация комплемента и инфильтрация лейкоцитов. Кроме того, РФ выступает важным показателем в дифференциальной диагностике и прогнозировании течения болезни для пациентов с артритом. Изотипы РФ могут присутствовать в доклинической стадии за годы до начала РА [97, 228]. Также сообщалось, что производство изотипа антитела начинается с IgM, затем IgA, и, наконец, IgG [100]. Следует отметить, что высокий титр РФ тесно связан с неблагоприятным прогнозом, более тяжелым заболеванием суставов, повышенной активностью заболевания и снижением показателей ремиссии, более высокой распространенностью внесуставных проявлений и повышенной заболеваемостью и смертностью. Однако РА может быть классифицирован как сероположительный или сероотрицательный в зависимости от наличия или отсутствия РФ [100, 227]. Кроме того, IgM РФ часто могут быть обнаружены с помощью различных анализов с использованием цитруллинированных пептидов, чаще всего с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Здесь наиболее часто используемым методом является CCP2 с нераскрытой специфичностью. Тест Axis-Shield Anti-CCP – это полуколичественный/количественный иммуноферментный анализ (ELISA) для выявления аутоантител класса IgG, специфичных к циклическому цитруллинированному пептиду (CCP) в сыворотке (включая пробирки с сепаратором сыворотки) или плазме (ЭДТА, гепарин лития или цитрат натрия) человека. Обнаружение антител к CCP используется в качестве вспомогательного метода диагностики ревматоидного артрита и должно использоваться в сочетании с другой клинической информацией. Уровень аутоантител представляет собой один из параметров многокритериального диагностического процесса, включающего как клинические, так и лабораторные оценки. Повышенный уровень РФ может быть важной особенностью клинического применения для выявления пациентов на ранней стадии заболевания и нахождения подгрупп пациентов, нуждающихся в активной терапии [227].

Роль аутоантител к измененным белкам в РА

Помимо РФ, аутоантитела к измененным белкам (AMPAs) являются также признаком РА. Широкий спектр соединения классов AMPA с различными

модификациями белков, включая цитруллинирование, карбаминрование и ацетилирование, характерен для РА [231, 104].

Цитруллинирование белков – общий физиологический процесс, однако он может также произойти в процессе воспаления, посредством чего пептидиларгининдезиминаза (PAD) фермента взаимодействует с определенными связывающими участками на белках и преобразовывает их выставленные цепи стороны аргинина в цитруллин [234]. Процесс цитруллинирования, преобразовывая положительно заряженный аргинин в полярный незаряженный цитруллин, может влиять на соединение водорода и ионное взаимодействие и поэтому вмешивается в организованную структуру белка, возможно приводя к дестабилизации или даже подавлению меж- и внутримолекулярных взаимодействий [240, 96, 237]. Кроме того, Лундберг и соавторы показали, что цитруллинирование является доминирующим механизмом для усиления аутоиммунитета, серьезность артрита коррелирует с PAD и суммой цитруллинированных белков на пораженных суставах [139]. Как ответ на цитруллинрование белков В-клетки вызывают производство АСРА. Ответ АСРА полагается на различные изотипы, включая IgG, IgA и IgM [249], из-за чего повышенный уровень IgM и IgA обнаруживаются приблизительно у 60% пациентов [101, 262]. Пациенты РА показывают нестандартную гуморальную иммунную реакцию против цитруллинированных белков, экспрессированных во всех очагах воспаления. Таким образом, процесс цитруллинирования происходит в большей части воспаленных тканей, и это подтверждает, что цитруллинирование – процесс, связанный с воспалением, который должен допускаться иммунной системой. Известно, что в различных физиологических механизмах, таких как апоптоз, сигнальные пути, внутриклеточная концентрация кальция увеличивается до уровней, значительно превышающих норму. Это увеличение в конечном счете приводит к активации фермента PAD [248]. Кроме того, аутоантитела могут быть произведены после воздействия цитруллинированных пептидов в иммунной системе генетически предрасположенных людей. Арну и коллеги продемонстрировали в модели мыши, что производство АСРА может быть вызвано иммунизацией PAD.

У пациентов с РА были определены несколько аутоантител, включая антитела к карбамилированному белку (anti-CarP), анти-PAD и анти-малодиальдегид антитела. Карбамилирование – неферментативная посттрансляционная модификация, посредством чего изоциановокислая кислота взаимодействует со свободными аминовыми группами аминокислот. Хотя anti-CarP могли быть идентифицированы до начала болезни, они были обнаружены и проанализированы у значительной группы пациентов с РА. Нужно также отметить, что anti-CarP могут даже присутствовать у пациентов с РА, которые сероотрицательны и по АСРА, и по РФ [59, 215]. Кроме того, обширное карбамилирование может стимулировать аутоиммунную обратную связь против карбамилинированных белков у восприимчивых людей. Было продемонстрировано, что основные иммунные реакции, хемотаксис, активация Т-клеток, производство антитела и IL (Интерлейкин)-10-, IL-17-и продукция интерферона (IFN)-γ могли быть вызваны карбамилинированными белками. Нужно отметить, что карбамилированные и цитруллиновые пептиды дополнительно способствуют выявлению аутоиммунных ответов [202].

Иммуновызывающее воздействие карбамилирования увеличивает артритогенные особенности цитруллированных пептидов, это представляет новый механизм действия для патогенеза аутоиммунного артрита. Наличие антител anti-CarP коррелировало с тяжестью болезни и значительной нетрудоспособностью пациентов с РА [95].

Надо отметить, что статистически значимые корреляции были найдены у АСРА-положительных и отрицательных пациентов [165]. Например, присутствие антител anti-CarP у пациентов с артралгией предлагает АСРА-независимое развитие РА. Таким образом, антитела anti-CarP можно рассмотреть как полезные индикаторы в идентификации потенциальных РА-пациентов в некоторых случаях [216], поскольку ряд исследований показал, что их свойства в качестве надежного биомаркера для диагностики РА ограничены [218]. В целом, можно прийти к заключению, что комбинация антител anti-CarP, АСРА и RF особенно значима для ранней диагностики пациентов с РА [217].

Антитела к пептидиларгининдеиминазе 4 (anti-PAD) были идентифицированы как ген восприимчивости в исследовании Сузуки и сооавторов, где использовались однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а также исследовалась сыворотка пациентов с РА [234]. Более того, авторы показали в своем исследовании, что описанный ген связан с более высокими уровнями антител к цитруллинированному пептиду у пациентов с РА [234]. Интересно, что это изменение уже может быть выявлено на ранних стадиях РА у человека, после чего иммунная система разрушается и возникают серьезные проблемы аутоиммунитета [234]. Недавно было выявлено, что автоцитруллинирование PAD4 в качестве контрольного механизма может инактивировать фермент путем изменения структуры фермента [53], что приводит к увеличению его распознавания человеческими аутоантителями. Кроме того, anti-PAD4 аутоантитела могут быть обнаружены примерно у 35% пациентов с РА (с более чем 95% специфичностью). Антитела anti-PAD4 имеют прогностическую ценность для пациентов с РА, потому что они могут нацеливаться и активировать PAD, повышая каталитическую эффективность фермента за счет снижения его потребности в кальции. Функциональные эффекты антител anti-PAD4 зависят от их взаимодействия с различными PAD4 субстратами или эпитопами, которые они связывают. Кроме того, предполагается, что антитела anti-PAD4 могут оказывать негативное влияние на активность PAD4, нарушая его димеризацию, которая необходима для полной активности фермента и потенциально может привести к совместной деградации протеазами человека. Нарушение PAD4 может также усиливать воспалительный ответ, поддерживая активацию системы комплемента и вызывая секрецию цитокинов [197]. Тем не менее антитела anti-PAD4 не имели значительной связи с уровнями АЦЦП и активностью заболевания у пациентов. Однако, поскольку они обычно идентифицируются после появления АЦЦП, предполагается, что они связаны с существованием антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду[247]. Анти-b-Raf аутоантитела активируют функцию b-Raf киназы, что может привести к выработке провоспалительных цитокинов и воспалению суставов. Эти антитела продуцируются приблизительно у 21-32% пациентов с РА [55]. Интересно, что почти треть anti-CCP2 негативных пациентов с РА являются

анти-b-Raf-положительными [55, 16]. Таким образом, это одни из самых интересных аутоантител для классификации АЦЦП-отрицательных пациентов с РА [92]. Более того, антитела к гетерогенному рибонуклеопротеину A2/B1 (Anti-RA33) и Т-клеткам, нацеленным на RA33, также могут быть связаны с аутоиммунитетом и воспалением [254]. Они могут оказывать свое действие через образование иммунных комплексов или через индукцию секреции цитокинов, которая может вызвать каскад реакций, запускающий развитие РА. Патогенные функции anti-RA33 антител еще предстоит выяснить. Они могут быть обнаружены на самых ранних стадиях РА или даже за годы до начала клинических проявлений. Однако часть исследований показывает, что эти антитела не вносят существенного вклада в повреждение кости или активность заболевания [235].

Роль эпигенетических модификаций и гликозилирования в РА

Эпигенетика – это исследование клеточных и физиологически обратимых изменений функции генов, в то время как последовательность ДНК не изменяется. Другими словами, эпигенетика включает наследственные изменения в экспрессии генов без модификации генетических структур. Эпигенетические механизмы чувствительны к внешним стимулам, и эпигенетические изменения имеют решающее значение для развития иммунных клеток и модуляции процессов их дифференцировки. Эти процессы имеют большое значение для созревания антител и аутоантитивного ответа [92, 207]. После отбора для пролиферации и выживания В-клетки дифференцируются либо в плазму, либо в клетки памяти в зависимости от различных стимулов, которым они подвергаются. Например, В-клетки памяти дифференцируются в плазматические клетки в ответ на стимуляцию антигенами и Toll-подобными рецепторами (TLR) среди других факторов [87, 275]. Эпигенетические механизмы включают регуляцию экспрессии генов посредством метилирования ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и некодирующие РНК (нкРНК). В отличие от генетических мутаций, эпигенетические изменения обратимы, что делает их подходящей терапевтической мишенью. Недавно сообщалось о применении лекарственных средств (например, азацитидина, этиностата, вориностата, таземетостата, молибресиба), которые модифицируют эпигенетические изменения, при лечении нескольких видов рака, неврологических состояний и заболеваний сердца [103, 244]. Поскольку эпигенетические модификации необходимы для регуляции экспрессии генов, эпигенетическая терапия может быть важным рычагом для диагностики и лечения РА [87, 49]. Метилирование и деметилирование регулируют экспрессию специфических, зависимых от ткани генов. Показано, что при развитии В-клеток костного мозга и периферической дифференцировки в геноме В-клеток происходит прогрессирующее деметилирование [49]. Пассивное или активное деметилирование может деметилировать 5-метилцитозин до его неметилированной формы [49, 22]. Деметилирование ДНК возникает при дифференцировке В-клеток в плазматические клетки [236]. Кроме того, структура метилирования ДНК изменяется и при РА, что приводит к прогрессированию заболевания [261]. Следует отметить, что гены РА фибробластоподобных синовиоцитов (FLS)

и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) гипометилированы у пациентов с РА [66]. Гипометилированные локусы также были обнаружены в других ассоциированных с РА родственных генах, таких как сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 3 (STAT3) [168]. Активация этого гена связана с повышенной экспрессией IL-6, который играет ключевую роль в патогенезе РА [125]. Изменение схемы метилирования ДНК на ранних стадиях развития РА повлияло на прогрессирование заболевания. При этом уровень метилирования промотора IL-6 в PBMC у пациентов с РА значительно ниже, чем у здоровых контрольных пациентов [198].

Другим важным эпигенетическим изменением является измененный паттерн модификации гистонов, который может играть роль в развитии РА [171]. Кроме того, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование и сумоилирование представляют собой различные ковалентные посттрансляционные модификации гистонов. Баланс между гистонацетилазами и гистондеацетилазами является существенным, но у пациентов с РА наблюдалось гистоновое гиперацетилирование [94]. Здесь гистон H3 FLS у пациентов с РА был высоко ацетилирован в промоторной области гена IL-6, и было показано, что ингибиторы гистоновой ацетилтрансферазы (HAT), такие как куркумин, снижают секрецию IL-6, что указывает на важность эпигенетических механизмов в патогенезе РА [259]. Обратимое ацетилирование является одной из наиболее важных модификаций в остатках лизина. Эта модификация регулируется гистондеацетилазами (HDAC), которые участвуют в конденсации хроматина, подавлении транскрипции, дифференцировке подмножеств Т-клеток и аутоиммунных заболеваниях, опосредованных Т-клетками. Поскольку экспрессия большого числа генов контролируется HDAC и они модулируют различные белковые функции посредством деацетилирования не гистонов, они могут играть роль при расстройствах и заболеваниях. Гликозилирование – посттрансляционная модификация, оказывающая значительное влияние на биологические функции, и модификация может привести к воспалительному ответу в гуморальной иммунной системе [209]. Следует отметить, что пациенты с аутоиммунными заболеваниями, такими как РА, подвергаются различным схемам гликозилирования общего IgG [196]. Кроме того, фукозилирование, галактозилирование и сиалилирование являются различными типами гликозилирования антител [173]. Несколько исследований показали значимость гликозилирования в вариабельных Fab-областях антител, которое происходит более чем в 90% IgG-ACPA [9]. Однако степень гликозилирования вариабельных доменов значительно выше, и в зависимости от типа и состава гликанов [82] гликозилирование антител может функционировать про- или противовоспалительным способом [204]. Следует отметить, что уровень фукозилирования повышается у пациентов с РА, особенно во время хронического воспаления [208], но уровень сиалирования снижается в IgG этих пациентов, а также на мышиных моделях [82,208]. Галактозилирование и сиалилирование являются ключевыми игроками в регуляции эффекторной функции антитела [111]. Сиализация антител изменяет их структурную конформацию, снижает их сродство к Fcγ R и, следовательно, их воспалительные эффекторные функции. В ACPA Fab-домены

сильно галактозилируются и сиализируются, а у пациентов с РА характер Fc-гликозилирования изменяется в АСРА [130]. Добавление различных сайтов N-гликана и гликозилирования на вариабельные домены IgG коррелирует с риском развития РА [220].

Недавно анализ кристаллических структур АЦЦП показал, что V-доменные гликаны расположены вблизи связывающего кармана. Их динамическое моделирование показало потенциал гликанов V-домена к взаимодействию с антигенсвязывающими областями. Примечательно, что В-клетки человека, несущие гликозилированные В-клеточные рецепторы V-домена (по сравнению с их негликозилированными аналогами), подвергаются повышенной передаче сигналов после стимуляции. Кроме того, наночастицы на основе гликана в последнее время используются для усиления иммунной системы.

Перекрест аутоантител и Т-клетки при РА Патогенез РА обычно происходит в синовиальных суставах, где иммунные клетки проникают в синовий. Кроме того, количество фибробастоподобных синовиоциотов (ФС) в подстилающем слое синовия значительно увеличивается, что приводит к образованию паннуса. Кроме того, ФС способствуют разрушению хряща и деградации суставов путем генерирования цитокинов (IL-6, IL-8) и матриксно-разрушающих протеаз (MMP), которые помогают поддерживать воспалительное заболевание при РА. Из-за обилия Т-клеток памяти CD4+ в поврежденных суставах пациентов с РА и расширения клонов CD4+ в синовиальной ткани раннего заболевания пролиферация Т-клеток может быть вызвана местными антигенами. Аутоиммунное заболевание РА обычно связано с геном основного комплекса гистосовместимости класса II (MHC II). Эти гены являются наиболее существенными в так называемом серопоположительном или классическом РА. Идентичность или функция MHC II не была окончательно установлена при заболевании. Однако эта связь дает убедительные доказательства того, что аутореактивные Т-клетки участвуют в ранних стадиях патогенеза РА. Следует отметить, что В-ячейки не требуются для активации Т-ячеек, хотя Т-ячейки обычно требуются для генерации клеток В-линии, продуцирующих IgG с коммутацией классов [276,177].

Штастни и соавторы первыми установили связь между РА и HLA-DRB1, и их результаты были дополнительно подтверждены полногеномной ассоциацией исследований GWAS [81, 271]. Эта ассоциация в конечном итоге привела к вышеупомянутой «общей гипотезе эпитопа», продвигаемой Грегерсеном и коллегами, что стало вехой в дальнейшем исследовании РА. Согласно концепции данной гипотезы, пятиаминная последовательность, обнаруженная в специфических аллелях HLA-DRB1 (общий эпитоп), связана с повышенной восприимчивостью к РА, способствуя риску заболевания РА [79]. Исходя из этого, Хилл и соавторы впервые предложили, что DRB1 аллели с общим эпитопом могут вызывать аутоиммунный ответ на цитруллинированные антигены РА из-за значительного увеличения взаимодействия MHC-пептида, сопровождающегося активированным ответом CD4 + Т-клеток у трансгенных мышей HLA-DRB 0401 [50]. Позднее был открыт новый цитруллинированный пептид CII, основанный на его способности активировать CD4 + Т-клетки от HLA-DRB1 10:01 положительных индивидуумов, что привело к продукции провоспалительных цитокинов (IFN-γ, TNF, IL-17,

IL-13, IL-10) [230]. В большом исследовании, проведенном Сидни с коллегами, более 200 цитруллинированных пептидов коллагена II и виментина были проанализированы для исследования их связывающих свойств. Здесь было обнаружено, что 117 пептидов связываются со значительно близким к HLA-DRB1 01: 01/HLA-DRB1 04:01 RA-ассоциированным общим эпитопным аллелям. Предполагается, что цитруллинирование оказывает еще более сильное влияние на распознавание Т-клеток, чем само связывание HLA [90].

Было также показано, помимо общей антигенной детерминанты, генетический код PTPN22, CD28 и CTLA4 (ответственный за Т-клеточную-активацию и дифференцирование), были ассоциированы с РА [229, 44, 221]. Однако поиск иммунодоминирующих антигенных детерминант Т-клетки остается главной отправной точкой в области исследования РА. Важные подмножества CD4 + Т-клетки, вовлеченной в РА, включают клетки Т-хелпера (Th) 1, Th17, регуляторные Т-клетки (Treg), Tfh и цитотоксические клетки. На самом деле в синовиальном суставе активация макрофага вызвана клетками Th1 и характеризуется повышенной способностью к производству цитокина, включая фактор некроза опухоли (TNF) [178, 179].

Кроме того, по результатам анализа пептид-HLADR-тетрамер ex vivo в синовиальном суставе обнаружены индуцированные Th17-клетками цитокины [28] и показано, что синовиальный IL-17 индуцирует резорбцию кости у пациентов с РА.

Кутан и соавторы показали, что дисфункциональные дендритные клетки не только связаны с аутоиммунными заболеваниями, но также и способствуют повышению колическива Th17 посредством измененной секреции цитокина. Было предположено, что IL-17-продуцирующие Т-клетки могли играть роль в ранней стадии РА [48]. Кроме того, FOXP3 + CD25 + CD4 + Tregs накапливаются и в синовиальной жидкости, и в тканях пациентов с РА [43]. Кроме того, ex-vivo исследования подтвердили существование CD4 + Т-клетки с цитотоксическим потенциалом (CD4 + CTLs) при различных человеческих вирусных заболеваниях, таких как цитомегаловирус (CMV), Вирус Эпштейна-Барр (EBV), грипп, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), лихорадка, Ортохантавирус (Hantavirus) и парвовирус B19 [13, 89, 102], хотя сумма периферийного CD4 + CTLs обычно очень низкая у здоровых людей [182]. Также обнаружено, что количество CD4+CD28-Т-клеток значительно увеличивается при аутоиммунных заболеваниях, таких как РА. Было уже продемонстрировано, что Т-клетки рецепторы (TCR) играют большую роль в распространении артрита. Поэтому некоторые исследования сосредоточились на мутациях TCR, которые могли привести к измененной передаче сигналов TCR, увеличивая число аутореактивных Т-клеток и в конечном счете развитие артрита [239]. Кроме того, эндофилин A2 (EA2) был идентифицирован как регулятор интернализации TCR, трансдукции сигнала и нисходящих функций исполнительного элемента Т-клетки, и дефицит этого гена существенно регулирует артрит и мог бы привести к защите от аутоиммунитета [206], ограничив индукцию аутореактивных Т-клеток. Понимание его влияния на механизм Т-клеточной-активации может привести к новому пониманию и терапевтическим решениям для РА и всех других Т-клеточнозависимых воспалительных заболеваний.

Роль аутофагии и окислительного стресса в развитии РА

Аутофагия – это жизненно важный физиологический процесс, который направляет клетки реагировать на повреждение, уничтожая бесполезные и неосновные самокомпоненты. Несмотря на свою роль в патологии человека, аутофагия участвует в обороте органелл и элиминации белковых агрегатов [14]. Во время клеточного стресса он отвечает за деградацию внутриклеточных компонентов, продуцируя аденозинтрифосфат (АТФ) и поддерживая основные клеточные функции [174]. Однако процесс аутофагии может быть обоюдоострым мечом: на сегодняшний день появляется все больше доказательств того, что аутофагия может вызывать аутоиммунные заболевания [110], и, наблюдая повышенные уровни в синовиальной ткани пациентов с РА, было показано, что аутофагия способствует развитию РА [270]. Комплекс 1 mTOR (mTORC1), который действует как датчик уровня энергии клеток, играет важную роль в индукции аутофагии. Он ингибируется питательным голоданием, что приводит к активации аутофагии. Действительно, нарушения в PI3K/AKT/mTOR сигнальной оси были обнаружены у пациентов с РА [258], поэтому подавление передачи сигналов mTOR может быть альтернативным подходом для лечения РА [283].

Кроме того, Неджич и соавторы сообщили о высоком уровне аутофагии в протеин-тирозинкиназах (ПТК), и это наблюдение может предполагать роль аутофагии в развитии репертуара лимфоцитов во время отбора тимуса. В соответствии с этим исследованием недавно было показано, что отбор MHC II-ограниченных TCR был изменен у мышей, трансплантированных ATG5 −/− тимусом. Кроме того, нарушение аутофагии и отсутствие самодостаточности могут быть причиной многочисленных аутоиммунных симптомов, о которых сообщается у этих животных [144]. Аутофагия может участвовать в длительном аутоиммунном ответе, который способствует выживанию аутореактивных и воспалительных клеток, секреции цитокинов и презентации цитруллинированного антигена. В свете этого модуляторы аутофагии можно рассматривать как еще один терапевтический вариант повышения эффективности лечения РА [283]. Основываясь на роли Th1-клеток в РА, которые при активации приводят к остеокластно-регулируемому разрушению кости, недавние данные свидетельствуют о том, что аутофагия может быть вовлечена в остеокластогенез. В частности, гипоксия, которая запускает активацию аутофагии, по-видимому, провоцирует созревание остеокластов [32]. Кроме того, было показано, что рецепторный активатор терапии NF-λ B лиганд (RANKL) может привести к повышенной регуляции маркеров, связанных с аутофагией. Нокдаун грузового белка p62 может снизить экспрессию генов, связанных с остеокластогенезом [170]. Действительно, ингибирование аутофагии облегчило эрозию кости и количество остеокластов на экспериментальных моделях мышей с артритом [282]. Эти наблюдения показывают, что аутофагия играет решающую роль в распаде костной ткани. В результате препараты, направленные на снижение регуляции аутофагии, могут быть использованы у пациентов с РА для предотвращения резорбции костей [131].

Аутофагия – это генетически контролируемый процесс, который способствует выживанию клеток в условиях дефицита питательных веществ,

и корреляция между аутофагией и апоптозом, поскольку два физиологических процесса изменяют судьбу клеток [160]. Поскольку аутофагия устраняет поврежденные митохондрии, она играет роль в снижении активных форм кислорода (АФК) и дефектной ДНК, соответственно препятствуя апоптозу [133, 153]. Баланс между выживанием и смертью клеток играет ключевую роль в патогенезе РА. Более того, апоптоз помогает прекратить воспаление посредством блокирования крайней активации иммунных клеток и секреции цитокинов. Фактически было показано, что апоптоз подавляется в ткани РА [65, 264]. При РА фибробластоподобные синовиоциты (FLS) претерпевают многогранную картину молекулярных изменений, приводящих к активации родственных генов и путей (например, AP-1, NF-kB путь), которые, как полагают, ответственны за их агрессивный и инвазивный фенотип [135]. Устойчивость FLS к апоптотической индукции может быть причиной прогрессирующего ухудшения состояния тканей кости и хряща, и могут быть задействованы различные внутриклеточные процессы, такие как аутофагия. Однако взаимодействие между аутофагией и апоптозом все еще остается спорным [116].

Более интересно, что индукция аутофагии может привести к самозащите клеток РА от апоптоза и увеличению продолжительности жизни. В соответствии с этой гипотезой стресс эндоплазматического ретикулума (ER) может вызвать более высокую аутофагию у пациентов с РА по сравнению с пациентами с остеоартритом (ОА) [183]. Более того, при РА FLS, по-видимому, более устойчивы к индукции гибели клеток [73, 219]. Фактически в синовиальных тканях больных РА существует обратная связь между аутофагией и апоптозом. Это свойство может подтвердить связь аутофагии с апоптоз-устойчивым фенотипом синовиоцитов при РА. Согласно недавнему отчету в мышиной модели, ингибирование аутофагии может уменьшить синовиальное воспаление и увеличить апоптоз синовиальных клеток, регулируя PI3K/AKT сигнальные пути. Действительно, эти данные свидетельствуют о том, что аутофагия играет важную защитную роль против апоптоза. Поэтому терапевтические подходы, основанные на подавлении аутофагии, могут оказать значительное влияние на лечение РА.

Новые стратегии лечения

Современное стандартное лечение РА включает применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), в основном используемых для контроля боли и воспаления, глюкокортикоидов (ГК) и модифицирующих заболевание противоревматических препаратов (DMARD). Пациенты с ранним диагнозом РА могут извлечь пользу из этих методов лечения для облегчения воспаления и других симптомов заболевания, поскольку эти методы лечения нацелены на ингибирование медиаторов воспаления для лечения симптомов и предотвращения прогрессирования заболевания. Однако длительное введение этих лекарств может вызывать побочные эффекты, такие как желудочно-кишечные проблемы, связанные с рвотой, язвой желудка, изжогой или желудочно-кишечным кровотечением. Таргетная терапия и новые стратегии могут помочь в минимизации этих побочных эффектов и одновременно

повысить эффективность лечения. Поэтому в настоящее время изучается множество различных подходов, которые приводятся в настоящем разделе. Фактор некроза опухоли (ФНО) является центральным цитокином в воспалительном каскаде и играет ключевую роль в воспалительных заболеваниях. Следовательно, предполагается, что это также оказывает значительное влияние на патогенез РА, где повышенные уровни ФНО-α наблюдаются в синовиальной жидкости пациентов с РА [268]. Следовательно, ингибирование ФНО является важной мишенью для облегчения симптомов при лечении РА [109, 60]. На сегодняшний день пять TNF-ингибирующих препаратов были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), Европейским агентством по лекарственным средствам EMA и используются в клинических условиях для терапии РА [17]: Инфликсимаб, химерное мышино-человеческое моноклональное антитело (mAb); Этанерцепт, растворимый слитый белок человеческого димерного TNF-рецептора; Адалимумаб и Голимумаб, полностью человеческие моноклональные антитела; и Цертолизумаб пегол, только рекомбинантное гуманизированное антитело. Использование препаратов ФНО привело к значительному повышению эффективности лечения и улучшению исхода заболевания при РА. Тем не менее есть пациенты, которым приходится прекращать лечение из-за неэффективности или побочных реакций, таких как повышенный риск инфекций, нарушения функций печени, гематологические изменения и неврологические расстройства, и частично из-за синтеза антидегментных аутоантантов, сопровождающих введение ФНО [193]. Аналогично TNF-α интерлейкин также является провоспалительным цитокином, который способствует патогенезу РА, инициируя и поддерживая синовиальное воспаление и связанное с ним разрушение тканей. Поэтому для медицинского применения были разработаны различные биологические агенты, нацеленные на интерлейкины (IL), включая препараты Анакинра и Канакинумаб, оба препарата, которые действуют как ингибиторы IL-1. В частности, IL-1 и IL-6 рассматриваются в качестве основных медиаторов при воспалении РА и его патологических эффектах. Более того, исследования показали, что IL-1 стимулирует разрушение хряща и ингибирует синтез его матрикса [15]. Анакинра, рекомбинантная форма антагониста рецептора интерлейкина-1 человека, была первым биологическим агентом, специально разработанным для блокирования передачи сигналов IL-1 в 1993 году [157]. Канакинумаб представляет собой моноклональное антитело человека, которое специфически связывается с IL-1ß без каких-либо перекрестных реакций с другими членами семейства IL-1 [161]. Несмотря на исследования, показывающие доказательства ингибирования разрушения тканей и улучшения клинических симптомов у пациентов с РА путем введения IL-ингибитора и его клинической эффективности, исследования также показали более низкую эффективность по сравнению с препаратами ФНО [205]. Кроме того, распространенные побочные эффекты во время лечения ингибиторами IL включают, например, инфекции мочевыводящих путей и дыхательных путей, нейтропению или эритему в месте инъекции. Помимо вышеупомянутых ингибиторов IL-1, существуют также лекарственные средства,

ингибирующие других членов семейства интерлейкина – например, Тоцилизумаб, представляющий собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, направленное против растворимых и мембраносвязанных рецепторов интерлейкина 6, или Сарилумаб, направленнай против рецептора IL-6 [5, 154]. Кроме того, члены семейства интерлейкина 17 (IL-17), состоящего из 6 структурно родственных цитокинов, являются более значимыми потенциальными триггерами при аутоиммунных заболеваниях и играют важную роль в воспалении, среди прочих (то есть, IL-21, IL-12/23). Другая терапевтическая стратегия, помимо упомянутых выше, является блокадой ко-стимуляции Т-клетки, чтобы смодулировать Т-клеточную-активацию [200]. Блокатор ко-стимуляции Абатацепт является одним из первых модуляторов ко-стимуляции, одобренных для терапии РА [52].

Также разработано много методов лечения, которые нацелены на В-клетки различными способами. Например, ритуксимаб, офатумумаб, велтузумаб или окрелизумаб, действующие в качестве CD20 антител, и эпратузумаб, вызывают истощение В-клеток посредством различных механизмов, включая апоптоз, комплементзависимую цитотоксичность и медиацию зависимой от антител клеточной цитотоксичности [194]. Другой распространенной мишенью в В-клетках является CD79, внедренная в плазматическую мембрану, которая является белком-мишенью для предшествующих плазматических клеток и В-клеток. Блокирование CD79 приводит к ингибированию сигнального пути рецепторов В-клеток, приводя к истощению В-клеток [213].

Кроме того, существуют подходы к разработке низкомолекулярных ингибиторов воспалительных путей при РА, таких как, например, фостаматиниб. Фостаматиниб ингибирует тирозинкиназу селезенки (Syk), которая является жизненно важной белковой тирозинкиназой рецепторного типа (PTK). В целом, стратегии, направленные на В-клетки, демонстрируют замечательную эффективность, поскольку В-клетки участвуют в различных механизмах при аутоиммунных заболеваниях, таких как РА. Однако реакция пациента на лечение нацеливанием на В-клетки может варьироваться из-за заболевания и гетерогенности пациента. Например, пациенты с РА могут иметь основную гетерогенность в синовии с точки зрения степени инфильтрации воспалительных клеток, что предполагает различные подмножества В-клеток и их вклад в заболевание. С учетом этого разумно предположить, что богатый синовиальными патотип с большей вероятностью реагирует на нацеливание на В-клетки, чем другие. Таким образом, нацеленная на В-клетки терапия может быть более или менее эффективной в зависимости от степени истощения В-клеток и относительного вклада в заболевание В-клеток [142]. В терапии РА также изучаются ингибиторы янус-активированной киназы (JAK). Передача сигналов JAK, внутриклеточная тирозинкиназа, была идентифицирована как важный путь среди других в регуляции иммунного ответа. Посредством сигнального пути JAK многие цитокины и другие молекулы, такие как интерфероны и факторы роста, могут выполнять свои функции, способствуя, следовательно, патогенезу различных иммунноассоциированных расстройств, включая РА [25, 185]. В отличие от здоровых людей, сигнальный путь JAK не регулируется у пациентов с РА, что приводит к непрерывной активации в синовиальных суставах РА и, следовательно, к повышению

уровня провоспалительных белков в воспаленной синовиальной ткани [190]. За последние 10 лет были разработаны многочисленные препараты, нацеленные на сигнальный путь JAK путем его ингибирования [25, 185]. В отличие от биологических агентов ингибиторы JAK не нацелены на внеклеточные белки, а направлены на подавление внутриклеточных белков. Семейство JAK состоит из четырех членов (JAK1, JAK2, JAK3, тирозинкиназа 2 (TYK2)) и молекул, которые опосредованы своим путем, осуществляют свои функции через рецепторы типа I и типа II. Рецепторы включают различные субъединицы, которые ассоциированы со специфическими JAK, особенностью, которая была использована в новых ингибиторах JAK, учитывая их специфичность по отношению к выбранным JAK. JAK-ингибирующий препарат Тофацитиниб нацелен на все JAK (JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 (в меньшей степени), действуя в качестве конкурентного ингибитора сайта связывания АТФ JAK, что приводит к ингибированию активации JAK и связанных с ней путей. В результате количество цитокинов, а также их продуцирование снижаются, а иммунный ответ модифицируется. В отличие от других ингибиторов JAK, таких как Барицитиниб (JAK1/JAK2), Упадацитиниб, (JAK1) или Филготиниб (JAK1), только некоторые из членов семейства JAK, которые могут быть полезны с точки зрения снижения побочных эффектов, сравнимых с биологическими препаратами. В целом ингибиторы JAK являются перспективными для лечения РА из-за их широкого спектра эффекторных молекул.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)

Поскольку ряд пациентов с РА устойчивы или даже не проявляют никакой реакции на принятые методы лечения РА, терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) дает возможность лечения, основанную на свойствах клеток самообновления, регенерации тканей и потенциале модуляции иммунного ответа [20,76]. Иммуномодулирующие эффекты МСК включают различные механизмы, включая клеточно-клеточный контакт, перенос внеклеточных носителей, содержащих передающие сообщения молекулы, и выработку растворимых факторов, включая IL-1, индоламиновую 2, 3-диоксигеназу, трансформирующий фактор β роста (TGF-λ), простагландин E2 и другие [20,162]. Осуществляя свои функции, МСК способны мигрировать в места воспаления, где они могут подавлять провоспалительную секрецию цитокинов, а также скорости пролиферации B- и T-клеток. Кроме того, МСК способны модулировать дифференцировку клеток, включая моноциты, дендритные клетки, макрофаги, миелоидно-супрессорные клетки и нейтрофилы, в направлении иммуносупрессивного фенотипа, что делает их перспективным кандидатом для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как РА.

Некоторые клинические испытания показали, что комбинированное лечение при РА (одновременное использование биопрепаратов и антиревматических препаратов), например ФНО и метотрексат, показало значительно более высокий ответ, чем использование одного из них в монотерапии [145]. Кроме того, тоцилизумаб в качестве комбинированной терапии с метотрексатом показал больше преимуществ по сравнению с монотерапией тоцилизумабом у пациентов, которые не проявили ответа

на монотерапию метотрексат. Однако введение комбинированного лечения часто зависит от индивидуальной реакции пациентов и тяжести их прогноза. Эпигенетические исследования приобрели огромное значение и клиническую значимость за последнее десятилетие. В основном это касается изменений в экспрессии генов и фенотипах клеток, которые не связаны с изменениями в последовательности ДНК, что добавляет новое качество и совершенно новую динамику в обзор экспрессии генов. Эпигенетические явления, такие как метилирование ДНК, ремоделирование хроматина, посттрансляционные модификации гистонов и некодирующие РНК [138,140,134], имеют фундаментальное значение для регуляции экспрессии генов в медицине, различных заболеваний и многочисленных процессов, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, аутоиммунные заболевания и рак [225, 129, 280, 12]. В дополнение к нескольким аутоиммунным заболеваниям, таким как РА, было также показано, что эпигенетические модификации усиливают воспаление в тканях посредством активации провоспалительного фактора транскрипции ядерного фактора каппа B (NF-λ B) [56, 166, 245, 279, 8]. Кроме того, эпигенетические явления, лежащие в основе противовоспалительного потенциала диеты и условий образа жизни, привели к разработке терапевтических действий для облегчения постоянного воспаления, влияющего на эпигеном. В этом контексте биологические компоненты в рационе (полифенолы) продемонстрировали противовоспалительное действие с помощью эпигенетических механизмов.

Куркумин (диферулоилметан) – природное полифенольное соединение, встречающееся в качестве основного компонента куркумы (Curcuma Longa), которое используется в качестве пряности и обладает широкой противовоспалительной активностью и доказанной пользой при лечении аутоиммунных заболеваний, включая РА. Основываясь на исследованиях, куркумин обладает энергичными противовоспалительными, антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [31, 37, 38, 39, 33] и является естественным ингибитором провоспалительного транскрипционного фактора NF-λ B, который опосредует регуляцию воспалительных цитокинов и белков при РА [36, 40, 203]. В пилотном клиническом исследовании была оценена общая эффективность и безопасность куркумина у пациентов с агрессивным течением РА, которое показало, что куркумин значительно улучшил показатель активности заболевания.

Ингибиторы ДНК-метилтарнфераз и гистоновых леацилетаз исследовались в течение десятилетий, но недавно были вновь обнаружены для лечения воспалительных заболеваний, включая РА. Было показано, что изменения и аномалии метилирования ДНК и ацетилирования гистонов участвуютв патогенезе РА [210, 34, 35]. Ферменты ДНК-метилтарнфераз и гистоновых леацилетаз представляют собой класс важных эпигенетических регуляторов, и их ингибирование дает возможность обратить патологические состояния вспять [211]. Исследования и клинические испытания с использованием ингибитора гистоновых леацилетаз (препарат Гивиностат) уже показали значительное улучшение патологических состояний, включая снижение боли и снижение уровня провоспалительных цитокинов.

Различные исследования показали, что белки, связанные с аутофагией и аутофагией, являются ключевыми игроками в регуляции иммунитета и играют важную роль в аутоиммунных заболеваниях, включая РА. Кроме того, было отмечено, что у мышей делеция этих связанных с аутофагией белков приводит к улучшению течения РА и предотвращению разрушения суставов [54]. Поскольку аутофагия оказывает сильное влияние на иммунные функции, способствуя удалению внутриклеточных бактерий, секреции провоспалительных цитокинов, ее модуляция рассматривается как еще одна мишень в терапии РА. Для модификации аутофагии используют различные терапевтические средства. Например, было показано, что введение аутофагистмодулирующих лекарственных средств в клинических применениях является успешным путем ингибирования лизосомы, что приводит к подавлению активности Т-клеток и устойчивости к апоптозу и снижению характерных повышенных уровней провоспалительных цитокинов при РА [167]. Рапамицин представляет собой другое вещество, нацеленное на аутофагию, путем активации аутофагии и одновременного ингибирования mTOR, которое активируется при различных воспалительных заболеваниях [257].

Понимание механизмов развития и течения РА очень сложно, и нет патентованного средства для лечения и устранения этого системного, многофакторного, воспалительного и прогрессирующего аутоиммунного заболевания. Обычные препараты могут в первую очередь замедлить боль и воспаление, предотвращая тем самым структурные дефекты тканей и улучшая повседневную жизнь пациентов. По мере прогрессирования заболевания часто требуется комбинированная терапия. Однако при хроническом приеме этих препаратов могут возникать многочисленные нежелательные побочные эффекты.

В литературе есть много доказательств того, что аутоантитела, эпигенетические изменения, посттрансляционные модификации и другие факторы участвуют в прогрессировании РА, но наше понимание патофизиологии РА остается слабым. Хотя исследования продолжаются в течение многих десятилетий, терапевтические вмешательства, направленные на различные пути, еще не были эффективно использованы в клинических условиях. Однако, если фармакогенетические и персонализированные исследования медицины доступны, побочные эффекты могут быть дополнительно сведены к минимуму путем лечения пациентов методами таргетной медицины. Это было бы возможно путем определения действительных биомаркеров, которые могут быть использованы для поиска адекватного препарата для каждого отдельного пациента. С другой стороны, необходимы новые методы для идентификации различных аспектов патогенеза РА, таких как клеточная и эпигенетическая терапия.

В настоящее время достижения в понимании молекулярной структуры и механизмов фитофармацевтических полифенольных соединений, таких как куркумин, и их способностей, особенно в качестве мощных противовоспалительных и эпигенетических модифицирующих компонентов, в основном способствовали клиническим испытаниям при лечении РА, профилактике или сопутствующем введении с другими лекарственными средствами, обычно используемыми в терапии РА.

Новое понимание роли микробиома на развитие РА показали авторы Университетского колледжа из Лондона. Исследователи проанализировали изменения в маркерах проницаемости кишечника, повреждения и воспаления в периферической крови и сыворотке пациентов с РА. Сыворотку, кишечник и лимфоидные органы, выделенные из мышей K/BxN со спонтанным артритом или из мышей дикого типа, генетически модифицированных интерлейкином (IL) -10R −/− или клаудином-8 −/− с индуцированным артритом, анализировали с помощью иммунофлуоресценции/гистологии, ELISA и проточной цитометрии. Пациенты с РА демонстрируют повышенные уровни сывороточных маркеров проницаемости и повреждения кишечника и клеточных маркеров самонаведения кишечника, оба параметра положительно коррелируют с тяжестью заболевания. Мыши с развившимся артиритом демонстрируют повышенную проницаемость кишечника с ранних стадий заболевания, а также бактериальную транслокацию, воспалительное повреждение кишечника, увеличение интерферона γ (IFNγ) + и снижение частоты инфильтрирующих кишечные лейкоциты IL-10 + и снижение экспрессии кишечного эпителия IL-10R. Механистически как артритогенные бактерии, так и лейкоциты необходимы для нарушения целостности кишечного барьера. Исследователи показали, что воздействие на кишечные органоиды IFNγ снижает экспрессию IL-10R эпителиальными клетками и что мыши, лишенные эпителиальных IL-10R, демонстрируют повышенную кишечную проницаемость и частые обострения артрита. У клодин-8 −/− мышей с конститутивно повышенной проницаемостью кишечника также развивается более агрессивная форма РА. Лечение мышей AT-1001, молекулой, которая предотвращает развитие проницаемости кишечника, улучшает течение артрита.

Авторы предполагают, что нарушение целостности кишечного барьера способствует развитию артрита, и предлагают восстановление гомеостаза кишечного барьера в качестве нового терапевтического подхода в лечении РА.

Канцерогенез мезенхимальных опухолей соединительной ткани

Саркомы – это злокачественные опухоли, возникающие из скелетных и внескелетных соединительных тканей, включая периферическую нервную систему. Примерно 76 процентов возникают в мягких тканях, остальные – в костях.

В большинстве случаев сарком мягких тканей не существует четко определенной этиологии, но был выявлен ряд ассоциированных или предрасполагающих факторов [274]. К ним относятся генетическая предрасположенность, генные мутации, лучевая терапия, химиотерапия, химические канцерогены, хроническое раздражение и лимфедема. Кроме того, связь между вирусной инфекцией и саркомами была показана для вируса герпеса человека 8 (HHV-8) при саркоме Капоши, а также для вируса Эпштейна-Барр (EBV) и опухолями гладкомышечного происхождения у пациентов с ослабленным иммунитетом.

Генетическая предрасположенность

Некоторые пациенты с саркомами костей и мягких тканей, особенно дети, имеют генетическую предрасположенность к раку [274, 128, 127, 85, 277]. В некоторых случаях пациенты происходят из семей с определенным наследственным предрасполагающим заболеванием, таким как синдром Ли-Фраумени (LFS) или ретинобластома, но не все случаи соответствуют критериям наследственных раковых синдромов. Один анализ, в котором 1162 пациента с саркомами, не отобранные по семейному анамнезу, подверглись направленному секвенированию экзонов 72 генов, отобранных по их ассоциации с риском развития рака, и ученые пришли к выводу, что примерно у половины пациентов были предположительно патогенные, моногенные и полигенные вариации в известных и новых генах рака [18]. В объединенном анализе всех пробандов с саркомами только 240 несли множественные варианты, что позволяет предположить полигенный вклад в риск развития саркомы. Только 155 (17 процентов) из 911 семей с известными родословными соответствовали критериям раковых синдромов. Основные генетические синдромы кратко описаны ниже.

Синдром Ли-Фраумени – мутации в гене TP53 являются наиболее распространенными герминальными мутациями, которые увеличивают риск возникновения сарком в детском возрасте, включая остеосаркому, недифференцированную плеоморфную саркому, рабдомиосаркому, лейомиосаркому и липосаркому [277]. У 7 процентов детей с саркомами мягких тканей выявлялся синдром Ли-Фраумени [42]. Например, в серии наблюдений из 151 ребенка с саркомами мягких тканей у пяти семей (3,3 %) выявился классический семейный онкологический синдром Ли-Фраумени, у 10 (6,6 %) были признаки, соответствующие синдрому, и у 16 (10,5 %) был один родитель с возможным наследственным раковым синдромом или проявлениями опухоли в возрасте до 60 лет [85].

Синдром Ли-Фраумени наследуется как аутосомно-доминантный признак, и герминальная мутация в гене-супрессоре опухоли TP53 обнаруживается в большинстве затронутых семей [69, 252, 147]. Синдром в первую очередь характеризуется развитием сарком мягких тканей и костей и раком молочной железы. Другие признаки включают опухоли головного мозга, лейкемию и рак коры надпочечников, возникающие в возрасте до 45 лет. Совокупный риск развития заболевания среди пострадавших лиц составляет 100 процентов к 70 годам [143]. Саркомы составляют от 25 до 33 процентов опухолей у пациентов с наличием мутации и возникают в более молодом возрасте, чем те, которые не связаны с синдромом Ли-Фраумени [143, 176]. По данным одного исследования, 96 % сарком, возникающих у лиц с синдромом Ли-Фраумени, возникли в возрасте до 50 лет, по сравнению с 38 % в возрасте до 50 лет в общей популяции [176].

Семейный аденоматозный полипоз и синдром Гарднера характеризуется высокой частотой развития интраабдоминального десмоидного фиброматоза среди пациентов с семейным аденоматозным полипозом (САП). Это сочетание также известно как синдром Гарднера [91]. Это заболевание характеризуется мутациями в гене APC (аденоматозный полипоз кишечной палочки).

Ретинобластома (РБ) – саркомы мягких тканей и костей, особенно остеосаркома, развиваются в более позднем возрасте у пациентов, излеченных от ретинобластомы (РБ), особенно при семейном или двусторонним типе наследования, при котором наследуется мутантная копия гена RB [58, 114, 273]. Сам ген, по-видимому, предрасполагает к развитию вторых опухолей костей и мягких тканей, при этом лучевая терапия, проводимая для лечения ретинобластомы, сокращает латентный период и увеличивает риск появления вторых опухолей [273, 113].

Эти взаимосвязи были проиллюстрированы в исследовании 1601 пациента с РБ (963 с наследственным типом) [114, 113, 265]. Совокупная частота развития второго рака через 50 лет после постановки диагноза значительно отличалась в зависимости от того, была ли у пациента генетическая форма РБ (двусторонние опухоли или одностороннее заболевание с положительным семейным анамнезом), по сравнению с негенетической формой РБ (т. е. одностороннее заболевание, отсутствие семейного анамнеза, наличие соматической мутации, 36 и 6% соответственно), также проведена оценка корреляции наличия второй опухоли с ранее проведенной лучевой терапией (38 и 21 %, соответственно) [114]. Более чем в 60 % случаев опухоли были саркомами.

В другой публикации приведено подробное описание 69 вторичных сарком мягких тканей у 68 детей с наследственной РБ [113]. Почти все саркомы (n = 66) развились у детей, получивших лучевую терапию на область орбиты, но в 18 случаях вне зоны поля облучения. Преобладающим морфологическим подтипом была лейомиосаркома (33 %), далее фибросаркома, недифференцированная плеоморфная саркома, опухоли мягких тканей/саркомы NOS, рабдомиосаркома и липосаркома (19, 17, 15, 12 и 4 % случаев, соответственно). Существовало несколько существенных различий между гистологическими типами. Лейомиосаркомы чаще диагностировались вне поля лучевой терапии (ЛТ), чем внутри него (14 из 23), что позволяет предположить, что генетическая предрасположенность, возможно, сыграла более важную роль, чем ЛТ. Лейомиосаркома также была единственной гистологией, риск развития которой был значительно выше среди пациентов, получавших химиотерапию с ЛТ, по сравнению только с ЛТ. Кроме того, это также были опухоли с поздним развитием. 18 были диагностированы более чем через 30 лет после постановки диагноза (т. е. в том же возрасте, что и у пациентов в общей популяции). Напротив, семь из восьми вторичных рабдомиосарком возникли в области ЛТ, а семь развились в течение 20 лет от окончания лечения, в течение периода нормального роста. Эти данные подчеркивают необходимость долгосрочного наблюдения за вторичными формами рака у выживших после РБ, особенно у тех, у кого двусторонняя или унаследованная форма заболевания.

Нейрофиброматоз – некоторые из множественных доброкачественных нейрофибром болезни фон Реклингхаузена (нейрофиброматоз 1 типа, NF1) могут претерпевать злокачественную трансформацию в злокачественные опухоли оболочек периферических нервов (ЗООПН). Кариотипические изменения, наблюдаемые при ЗООПН, как правило, сложны [30, 155]. NF1 связан с мутацией в гене NF1. Было высказано предположение, что злокачественная дегенерация отражает гипотезу с двумя попаданиями, в которой

один аллель конституционально инактивирован герминальной аллели, в то время как другой аллель подвергается соматической инактивации (второе попадание). Среди ненейрогенных сарком рабдомиосаркомы чаще возникают у пациентов с NF1, чем в общей популяции. В одной серии наблюдений риск развития злокачественной опухоли оболочки периферического нерва среди пациентов с NF1 составил 4,6 % по сравнению с 0,001 % среди общей популяции [62].

Другое – Синдром Ротмунда-Томсона (врожденная пойкилодермия) является аутосомным рецессивным заболеванием, характеризующимся типичными изменениями кожи (атрофия, телеангиэктазии, пигментация), редкими волосами, катарактой, маленьким ростом, аномалиями скелета и значительно повышенным риском развития остеосаркомы.

Генетика и молекулярный патогенез

Генетика сарком подразделяется на два основных типа: те, которые имеют специфические генетические изменения и обычно простые кариотипы, включая слияние генов вследствие реципрокных транслокаций (например, PAX3-FOXO1A при альвеолярных рабдомиосаркомах) или специфические точечные мутации (например, мутации KIT в стромальных опухолях желудочно-кишечного тракта [GIST]), и те, у кого неспецифические генетические изменения и сложные, несбалансированные кариотипы, отражающиеся многочисленными генетическими потерями и приобретениями (например, остеосаркома, недифференцированная плеоморфная саркома, ангиосаркома, лейомиосаркома).

Саркомы, связанные со слиянием генов, составляют примерно треть всех сарком [27]. Во многих случаях аберрантный белковый продукт слияния гена действует как аномальный регулятор транскрипции, обеспечивая таким образом молекулярную основу для онкогенеза. Точно так же, как специфические мутации в гене KIT влияют на диагноз и ответ на терапию в GIST, для многих сарком, связанных со слиянием, молекулярное тестирование для выявления специфических транслокаций, уникальных для определенных подтипов саркомы, может быть использовано для уточнения диагноза, прогностической оценки или и того и другого [99].

Напротив, молекулярный патогенез сарком с несбалансированным сложным кариотипом окончательно не доказан, но инактивация пути p53, по-видимому, является основным отличительным признаком между этими опухолями и опухолями с простыми генетическими изменениями [117].

Среди механизмов инактивации пути p53 – точечные мутации TP53, гомозиготная делеция в CDKN2A и амплификация MDM2.

Мутации соматических генов – существует высокая частота приобретенных (соматических) изменений генов при саркомах мягких тканей и костей. Например, в одном исследовании биопсийного материала опухолей сарком мягких тканей одновременное применение стандартной цитогенетики и плоидности ДНК методом проточной цитометрии выявило аномальную популяцию клеток одним или обоими методами в 84 процентах опухолей [158]. Это

обсуждение будет сосредоточено на тех мутациях, которые наблюдаются при саркомах мягких тканей и влияют на прогноз.

Соматические мутации в определенных генах варьируют в зависимости от гистологических подтипов сарком мягких тканей. В одном исследовании было проведено секвенирование ДНК 722 кодирующих белок генов, которые были вовлечены в развитие рака, из них 200 образцах сарком мягких тканей, включающих семь различных гистологических подтипов [21]. Часто мутировавшие гены включали ген-супрессор опухоли TP53 (17 % плеоморфных липосарком), NF1 типа 1 (10,5 % миксофибросарком и 8 % плеоморфных липосарком) и PIK3CA (18 % миксоидных липосарком). Ген ретинобластомы (RB1) был мутирован в 4 % плеоморфных липосарком. Амплификация ДНК хромосомы 12q наблюдалась у 90 % пациентов с дедифференцированными липосаркомами. Гены, амплифицированные в ампликоне 12q13-15 при высоко дифференцированных и дедифференцированных липосаркомах, включают MDM2, HMGA2, YEATS4, CDK4 и SAS [98].

При рабдомиосаркомах детского возраста было проведено полногеномное секвенирование. В одном исследовании были проанализированы 16 образцов рабдомиосаркомы у 13 пациентов и проведено сравнение результатовс нормальной тканью [46]. В другом исследовании были проанализированы 44 образца опухоли рабдомиосаркомы и сопоставлены с нормальной ДНК лейкоцитов [214]. Эти исследования представляют собой геномный анализ, который раскрывает ландшафт генных мутаций при рабдомиосаркомах. Эти исследования показывают, что рабдомиосаркомы делятся на две категории. Первая группа включает альвеолярные рабдомиосаркомы, которые содержат транслокацию PAX3 или PAX7 без других вторичных мутаций. Вторая группа – эмбриональные рабдомиосаркомы, которые характеризуются мутациями в рецепторе тирозинкиназы, RAS, PIK3CA. Интересно, что мутации в RAS или NF1, которые негативно регулируют Ras, были значимо связаны с более агрессивным течением болезни (т. е. рабдомиосаркомой среднего и высокого риска). Таким образом, RAS является критической мутацией-драйвером эмбриональной рабдомиосаркомы и потенциальной терапевтической мишенью [278].

Ген NF1 кодирует белок нейрофибромин, который функционирует как Ras-ГТФаза для подавления пути Ras [149, 267]. Потеря экспрессии NF1, которая происходит в злокачественные опухоли оболочек периферических нервов (ЗООПН) у пациентов с нейрофиброматозом I типа и при множестве других спорадических сарком мягких тканей [21], активирует передачу сигналов Ras. Большинство ЗООПН также имеют мутации с потерей функции в субъединицах модифицирующего гистон комплекса PRC2 (SUZ12 или EED), которые усиливают транскрипцию, управляемую Ras [124, 57].

Ген PIKC3A кодирует каталитическую субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), которая фосфорилирует липиды для создания вторичных мессенджеров, регулирующих клеточную пролиферацию, выживание и подвижность. Мутации PIK3CA при миксоидных липосаркомах связаны с более короткой продолжительностью специфической выживаемости [21].

Ген TP53 – Белок p53 является активатором транскрипции, который играет ключевую роль в интеграция сигналов, индуцирующих деление клеток,

остановку синтеза ДНК после повреждения ДНК и запрограммированную гибель клеток (апоптоз). Повреждение ДНК приводит к повышению уровня белка p53, который индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G1/S, тем самым позволяя клетке восстанавливать геномные повреждения или инициировать апоптоз [67, 119, 126]. Ген TP53 также функционирует как ген-супрессор опухолевого роста, и альтерации являются наиболее часто обнаруживаемыми мутациями в разнородной группе опухолей. P53 дикого типа в нормальной ткани имеет короткий период полураспада и не обнаруживается иммуногистохимическими методами. Для сравнения, мутации гена приводят к образованию стабилизированного белка p53, который накапливается в клетке и выявляется при иммуногистохимии.

Как отмечалось выше, герминальные мутации в гене TP53 присутствуют в большинстве семей с синдромом Ли-Фраумени [69, 252, 147].

Герминальные мутации линии в этом гене также могут возникать у пациентов с саркомами мягких тканей, особенно у пациентов с другими видами рака, которые не считаются признаками синдрома Ли-Фраумени [241, 146,152]. Например, в одном исследовании пациентов с саркомами герминальные мутации TP53 были относительно частыми (5 из 15) у пациентов с первично-множественными формами рака или наличием семейного онкологического анамнеза, но редкими (3 из 185) у пациентов без такого анамнеза [241].

Герминальные мутации TP53 также могут быть предрасполагающим фактором к трансформации в саркому у больных нейрофиброматозом 1 типа [256].

Соматические мутации в гене TP53 являются наиболее часто обнаруживаемым молекулярным изменением при спорадических саркомах мягких тканей. Эти мутации были обнаружены при различных саркомах мягких тканей, включая недифференцированную плеоморфную саркому, лейомиосаркому, липосаркому и рабдомиосаркому [242, 260, 191, 226, 233, 164, 184, 11, 26, 224].

Мутации в гене TP53 присутствуют примерно в трети опухолей [242, 191, 226]. В одной серии из 127 образцов сарком костей и мягких тканей у 42 были соматические изменения в гене TP53: половина была грубыми перестройками, а половина – незначительными миссенс- или нонсенс- мутациями [242]. Почти все перестройки и нонсенс-мутации не показали ИГХ окрашивания p53 («нулевой паттерн»), в отличие от сильного и диффузного паттерна при патогенных миссенс-мутациях (что говорит об увеличенном периоде полураспада белка) [260].

Кроме того, в 29 процентах случаев наблюдалось окрашивание (обычно слабое) без изменений в гене TP53. Соматическая потеря гена TP53, по-видимому, весьма изменчива при саркомах мягких тканей. Некоторые опухоли демонстрируют потерю обоих аллелей или потерю одного аллеля, при этом оставшийся аллель является либо нормальным, либо с точечной мутацией [164]. Описан случай исследования метастаза синовиальной саркомы – все клетки с мутацией TP53. Эта же мутация была обнаружена в виде небольшого клона в первичной опухоли, что указывает на то, что метастазирование произошло в результате экспансии мутантного клона TP53 [189].

На животных моделях показана патогенетическая роль дефектов TP53 при развитии сарком: ген ATRX – Альфа-талассемия/синдром умственной

отсталости, связанный с X (ATRX), является одним из наиболее часто мутирующих генов после TP53 при нескольких типах саркомы, включая лейомиосаркому [269] и остеосаркому [45]. Потеря экспрессии ATRX часто происходит при ряде сарком сложного кариотипа, включая ангиосаркому, недифференцированную плеоморфную саркому и дедифференцированную липосаркому[61].

Облученные трансгенные мыши, несущие мутант TP53, демонстрируют более высокую частоту развития сарком [123]. Трансдукция генов TP53 дикого типа в саркомы мягких тканей, несущие мутировавшие гены p53, восстанавливает контроль клеточного цикла и подавляет рост опухоли [188].

Восстановление функции p53 при первичных саркомах у мышей, у которых отсутствует экспрессия p53, вызывает регрессию опухоли [253].

Ген MDM2 (мышиный двойной гомолог minute 2), расположенный в 12q15, гиперэкспрессируется в различных опухолях человека, включая саркомы мягких тканей [180, 74, 112, 172]. Его генный продукт локализуется преимущественно в ядре, где он действует как ингибитор продукта гена-супрессора опухоли TP53. Продукт MDM2 функционирует путем сокрытия домена активации белка p53, тем самым ингибируя транскрипционную активность TP53 [159, 181].

В серии из 24 образцов опухолей сарком мягких тканей изменение p53 было обнаружено в восьми случаях и амплификация MDM2 еще в восьми [121]. Ни одна опухоль не содержала изменений в обоих генах, что согласуется с гипотезой о том, что генетические изменения TP53 и MDM2 являются альтернативными механизмами для инактивации одного и того же регуляторного пути подавления роста клеток. В другом исследовании 22 из 211 сарком мягких тканей показали повышенную иммунореактивность как к MDM2, так и к p53 [51]. Однако гиперэкспрессия белков p53 и MDM2 в ядрах этих клеток не всегда хорошо коррелировала с амплификацией гена в локусе MDM2 или мутацией в гене TP53.

Ген CDK4 кодирует циклинзависимую киназу, встречается в соседнем ампликоне в 12q14. Амплификация CDK4 была обнаружена при различных саркомах, включая высокодифференцированные и дедифференцированные липосаркомы [98, 106, 186]. Частая ассоциация с MDM2, предполагают синергический эффект в противодействии функции p53 [186].

Роль амплификации CDK4 в патогенезе сарком мягких тканей: предполагается факт, что нокдаун CDK4 в клеточных линиях липосаркомы или обработка этих клеток с помощью ингибиторов CDK4/6 подавляет пролиферацию [98].

Обнаружение гиперэкспрессии MDM2 и CDK4 с помощью иммуногистохимического метода может быть полезно для диагностики высокодифференцированных и дедифференцированных липосарком [10].

Ген YEATS4 располагается рядом с MDM2 в 12q15, амплифицируется вместе с MDM2 при высокодифференцированных и дедифференцированных липосаркомах [98]. YEATS4 функционирует как фактор транскрипции и отрицательно регулирует функцию p53 [136]. Следовательно, гиперэкспрессия YEATS4 может действовать синергично вместе с амплифицированным MDM2, блокируя функцию p53.

Ген HMGA2 не только амплифицируется с MDM2 при липосаркомах, но также часто подвергается внутригенным или близким к экстрагенным перестройкам [98]. Продукт гена HMGA2 представляет собой высокомобильный белок, который может накапливаться на хроматине стареющих клеток с образованием связанных со старением гетерохроматических очагов [169]. Способность HMGA2 вызывать старение (остановку клеточного цикла) отменяется гиперэкспрессией MDM2 и CDK4. Гиперэкспрессия HMGA2 способствует независимому росту, что является признаком онкогенной трансформации [169].

Лучевая терапия и химиотерапия

Лучевая терапия (ЛТ) вызывает саркомы костей и мягких тканей с высокой экспрессией кластера из 125 генов, что отличает их от других сарком. Синовиальные саркомы экспрессировали специфический кластер из 104 генов, среди которых молекулы, участвующие в путях ретиноевой кислоты, и рецептор эпидермального фактора роста.

Наиболее частым гистологическим типом радиоиндуцированных сарком мягких тканей является недифференцированная плеоморфная саркома. Наиболее распространенным гистологическим подтипом сарком костей является остеосаркома. Среди женщин, получавших ЛТ по поводу рака молочной железы, наиболее распространенной вторичной саркомой является кожная ангиосаркома. Частота увеличивается с увеличением дозы ЛТ и с периодом наблюдения после ЛТ и уменьшается с возрастом. Саркома в первую очередь является осложнением высокодозной терапии. Она редко наблюдается при использовании низких доз (<40 Гр). Частота возникновения в возрасте от 15 до 20 лет невелика, примерно 0,5 % для ЛТ на здоровые кости и мягкие ткани у взрослого человека, получавшего только ЛТ в полных дозах и без химиотерапии.

Частота вторичных сарком выше после ЛТ, получавших ее в детском возрасте. Риск наиболее высок у детей, которые получали ЛТ и химиотерапию (особенно антрациклины и алкилирующие агенты), а также у тех, кто проходил лечение от первичной саркомы или ретинобластомы.

В целом вторичные саркомы имеют худший прогноз, чем саркомы de novo.

Однако эти пациенты требуют агрессивного лечения, поскольку вторичные саркомы потенциально излечимы.

Промышленные химикаты

В качестве примеров: существует четкая связь между воздействием винилхлорида или мышьяка и ангиосаркомой печени [118] и вероятная связь между феноксигербицидами и саркомами мягких тканей [84, 264, 255]. Риск может быть выше при воздействии феноксигербицидов, содержащих 2, 3, 7, 8-тетрахлордибензо-п-диоксином (TCDD) или диоксинами с более высоким содержанием хлоридов [115, 71]. Роль диоксина как такового является спорной. Однако популяционное исследование «случай-контроль» не выявило повышенного риска развития саркомы мягких тканей среди ветеранов Вьетнама, включая тех, кто подвергался воздействию агента Оранж,

содержащего диоксин [238]. Высокоинтенсивное воздействие хлорфенола на работах, связанных с сохранением древесины, машинистами и использованием смазочно-охлаждающих жидкостей, может увеличить риск сарком мягких тканей, независимо от феноксигербицидов [263, 93]. Однако некоторые исследования не подтвердили эту ассоциацию [84].

Хронический отек, хроническое раздражение и травма

Саркомы мягких тканей (в первую очередь ангиосаркомы) могут возникать после массивного и продолжительного отека мягких тканей. Классически это наблюдалось при лимфедеме конечности после мастэктомии (синдром Стюарта-Тревеса) [232, 243]. Это также было описано при хронической лимфедеме, вызванной филярийной инфекцией [163].

Хроническое раздражение, вызванное инородными телами, также может быть фактором, вызывающим саркомы. Травма также может быть фактором развития сарком мягких тканей, включая десмоидные опухоли. У случайного пациента в анамнезе имеется серьезная травма пораженного участка за много месяцев до появления местных симптомов опухоли. Обычная история – это травматический инцидент, произошедший незадолго до осознания массы. Клиницисты часто объясняют такую последовательность событий тем, что травма просто привлекла внимание пациента к присутствию дополнительной опухолевой массы. Однако было показано, что травма способствует развитию сарком на животных моделях [223, 150]. Следовательно, необходимо дополнительное исследование пациентов, чтобы определить, способствует ли травма саркоматогенезу.

Заключение

Клиническая физиология (КФ), на наш взгляд, научное направление на стыке фундаментальных исследований в области биологии и фундаментальной медицины. Это научное направление должно индуцировать и генерировать исследования во всех областях, касающихся этого сегмента науки. При этом заказчиком исследования, на наш взгляд, должны быть опытные клиницисты, глубоко погруженные в эту проблему.

Таким образом, КФ костной и мышечной системы занимается изучением трех основных процессов, касающихся соединительной ткани.

- Изменения, возникающие в мышечных и костных тканях, связанные с экзогенным воздействием (травма, инфекция, инсоляция и т. д.) и ответной обратимой реакцией организма – это относится к обратимым физиологическим процессам.
- Аутоиммунные и генетически детерминированные процессы, вызывающие хронические воспаления (ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева, синдром Реклингхаузена и т. д.), нарушение процессов клеточной гибели, сбои в работе иммунной системы как со стороны врожденного, так и стороны приобретенного иммунитета, приводящие к развитию стойких хронических патологических состояний организма являются вторым аспектом исследований КФ.

• Третьим направлением, входящим в сферу изучения клинической физиологии, являются процессы старения соединительной ткани, некоторые генетические поломки, влияние агрессивной окружающей среды (в том числе радиации и канцерогенных веществ), ведущие к трансформации соединительной ткани (мышцы, сухожилия, кости, нервы и т. д.) и образованию злокачественных опухолей.

Список литературы

1. *Алиев М.Д.* Онкоортопедия: вчера, сегодня, завтра. Вестник Московского онкологического общества. 2013. № 5 (598). С. 3–4.
2. *Феденко А.А., Бохян А.Ю., Горбунова В.А., Махсон А.Н., Тепляков В.В.* Практические рекомендации по лекарственному лечению сарком мягких тканей. Злокачественные опухоли. 2021. Т. 11. № 3S2-1. С. 277–286.
3. Эффективность применения аутологичных факторов роста при повреждениях и заболеваниях костно-мышечной системы *Миронов С.П., Очкуренко А.А., Кесян Г.А., Савельев С.Н., Аркадьев А.А., Збараг Н.Н.*Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2014. № 1. С. 86–93.
4. *Мусаев Э.Р., Харатишвили Т.К., Мистакопуло Н.Ф.* Хирургическое лечение хондросаркомы таза. Российский онкологический журнал. 2001. № 5. С. 38
5. *Abramson, S.B.; Amin, A.* Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. Rheumatology 2002, 41, 972–980.
6. Adami, G.; Viapiana, O.; Rossini, M.; Orsolini, G.; Bertoldo, E.; Giollo, A.; Gatti, D.; Fassio, A. Association between environmental air pollution and rheumatoid arthritis flares. Rheumatology 2021, 60, 4591–4597.
7. *Aho, K.; Palusuo, T.; Kurki, P.* Marker antibodies of rheumatoid arthritis: Diagnostic and pathogenetic implications. Semin. Arthritis Rheum. 1994, 23, 379–387.
8. *Ai, R.; Laragione, T.; Hammaker, D.; Boyle, D.L.; Wildberg, A.; Maeshima, K.; Palescandolo, E.; Krishna, V.; Pocalyko, D.; Whitaker, J.W.* Comprehensive epigenetic landscape of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Nat. Commun. 2018, 9, 1–11.
9. *Albrecht, S.; Unwin, L.; Muniyappa, M.; Rudd, P.M.* Glycosylation as a marker for inflammatory arthritis. Cancer Biomark. 2014, 14, 17–28.
10. *Aleixo PB, Hartmann AA, Menezes IC, et al.* Can MDM2 and CDK4 make the diagnosis of well differentiated/dedifferentiated liposarcoma? An immunohistochemical study on 129 soft tissue tumours. J Clin Pathol 2009; 62:1127.
11. *Andreassen A, Oyjord T,* Hovig E, et al. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. Cancer Res 1993; 53:468.
12. *Araki, Y.; Wang, Z.; Zang, C.; Wood, W.H., 3rd; Schones, D.; Cui, K.; Roh, T.Y.; Lhotsky, B.; Wersto, R.P.; Peng, W.; et al.* Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. Immunity 2009, 30, 912–925.
13. *Arroyo-Villa, I.; Bautista-Caro, M.-B.; Balsa, A.; Aguado-Acin, P.; Nuno, L.; Bonilla-Hernan, M.-G.; Puig-Kröger, A.; Martin-Mola, E.; Miranda-Carus, M.-E.* Frequency of Th17 CD4+ T cells in early rheumatoid arthritis: A marker of anti-CCP seropositivity. PLoS ONE 2012, 7, e42189.
14. *Ashouri, J.F.; Hsu, L.-Y.; Yu, S.; Rychkov, D.; Chen, Y.; Cheng, D.A.; Sirota, M.; Hansen, E.; Lattanza, L.; Zikherman, J.* Reporters of TCR signaling identify arthritogenic T cells in murine and human autoimmune arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2019, 116, 18517–18527.

15. *Atiqi, S.; Hooijberg, F.; Loeff, F.C.; Rispens, T.; Wolbink, G.J.* Immunogenicity of TNF-Inhibitors. Front. Immunol. 2020, 11, 312.

16. *Auger, I.; Charpin, C.; Balandraud, N.; Martin, M.; Roudier, J.* Autoantibodies to PAD4 and BRAF in rheumatoid arthritis. Autoimmun. Rev. 2012, 11, 801–803.

17. *Bae, S.C.; Lee, Y.H.* Comparative efficacy and safety of biosimilar-infliximab and originator-infliximab in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. Int. J. Rheum. Dis. 2018, 21, 922–929.

18. *Ballinger ML, Goode DL, Ray-Coquard I, et al.* Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. Lancet Oncol 2016; 17:1261.

19. *Barik, R.R.; Bhatt, L.K.* Emerging epigenetic targets in rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. 2021, 41, 2047–2067.

20. *Barnas, J.L.; Looney, R.J.; Anolik, J.H.* B cell targeted therapies in autoimmune disease. Curr. Opin. Immunol. 2019, 61, 92–99.

21. *Barretina J, Taylor BS, Banerji S, et al.* Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. Nat Genet 2010; 42:715.

22. *Barwick, B.G.; Scharer, C.D.; Martinez, R.J.; Price, M.J.; Wein, A.N.; Haines, R.R.; Bally, A.P.; Kohlmeier, J.E.; Boss, J.M.* B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation. Nat. Commun. 2018, 9, 1–14.

23. *Begovich, A.B.; Carlton, V.E.; Honigberg, L.A.; Schrodi, S.J.; Chokkalingam, A.P.; Alexander, H.C.; Ardlie, K.G.; Huang, Q.; Smith, A.M.; Spoerke, J.M.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am. J. Hum. Genet. 2004, 75, 330–337.

24. *Behl, T.; Kaur, I.; Sehgal, A.; Zengin, G.; Brisc, C.; Brisc, M.C.; Munteanu, M.A.; Nistor-Cseppento, D.C.; Bungau, S.* The Lipid Paradox as a Metabolic Checkpoint and Its Therapeutic Significance in Ameliorating the Associated Cardiovascular Risks in Rheumatoid Arthritis Patients. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 9505.

25. *Blair, H.A.; Deeks, E.D.* Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. Drugs 2017, 77, 1221–1233.

26. *Blom R, Guerrieri C, Stâl O, et al.* Leiomyosarcoma of the uterus: A clinicopathologic, DNA flow cytometric, p53, and mdm-2 analysis of 49 cases. Gynecol Oncol 1998; 68:54.

27. *Borden EC, Baker LH, Bell RS, et al.* Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. Clin Cancer Res 2003; 9:1941.

28. *Borst, J.; Ahrends, T.; Bąbała, N.; Melief, C.J.; Kastenmüller, W.* CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 2018, 18, 635–647.

29. *Bottini, N.; Peterson, E.J.* Tyrosine phosphatase PTPN22: Multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. Annu. Rev. Immunol. 2014, 32, 83–119.

30. *Brekke HR, Ribeiro FR, Kolberg M, et al.* Genomic changes in chromosomes 10, 16, and X in malignant peripheral nerve sheath tumors identify a high-risk patient group. J Clin Oncol 2010; 28:1573.

31. *Brondello, J.-M.; Djouad, F.; Jorgensen, C.* Where to Stand with Stromal Cells and Chronic Synovitis in Rheumatoid Arthritis? Cells 2019, 8, 1257.

32. *Bruyn, G.A.; Tate, G.; Caeiro, F.; Maldonado-Cocco, J.; Westhovens, R.; Tannenbaum, H.; Bell, M.; Forre, O.; Bjorneboe, O.; Tak, P.P.* Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: A 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. Ann. Rheum. Dis. 2008, 67, 1090–1095.

33. *Buhrmann, C.; Brockmueller, A.; Harsha, C.; Kunnumakkara, A.B.; Kubatka, P.; Aggarwal, B.B.; Shakibaei, M.* Evidence That Tumor Microenvironment Initiates Epithelial-To-Mesenchymal Transition and Calebin A can Suppress it in Colorectal Cancer Cells. Front. Pharm. 2021, 12, 699842.

34. *Buhrmann, C.; Brockmueller, A.; Mueller, A.L.; Shayan, P.; Shakibaei, M.* Curcumin Attenuates Environment-Derived Osteoarthritis by Sox9/NF-kB Signaling Axis. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 7645.

35. *Buhrmann, C.; Honarvar, A.; Setayeshmehr, M.; Karbasi, S.; Shakibaei, M.; Valiani, A.* Herbal Remedies as Potential in Cartilage Tissue Engineering: An Overview of New Therapeutic Approaches and Strategies. Molecules 2020, 25, 3075.

36. *Buhrmann, C.; Kraehe, P.; Lueders, C.; Shayan, P.; Goel, A.; Shakibaei, M.* Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: Potential role of EMT. PLoS ONE 2014, 9, e107514.

37. *Buhrmann, C.; Mobasheri, A.; Busch, F.; Aldinger, C.; Stahlmann, R.; Montaseri, A.; Shakibaei, M.* Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. J. Biol. Chem. 2011, 286, 28556–28566.

38. *Buhrmann, C.; Mobasheri, A.; Matis, U.; Shakibaei, M.* Curcumin mediated suppression of nuclear factor-κB promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. Arthritis Res. 2010, 12, R127.

39. *Buhrmann, C.; Shayan, P.; Aggarwal, B.B.; Shakibaei, M.* Evidence that TNF-β (lymphotoxin α) can activate the inflammatory environment in human chondrocytes. Arthritis Res. 2013, 15, R202.

40. *Buhrmann, C.; Shayan, P.; Banik, K.; Kunnumakkara, A.B.; Kubatka, P.; Koklesova, L.; Shakibaei, M.* Targeting NF-κB Signaling by Calebin A, a Compound of Turmeric, in Multicellular Tumor Microenvironment: Potential Role of Apoptosis Induction in CRC Cells. Biomedicines 2020, 8, 236.

41. *Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, et al.* Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. N Engl J Med 1990; 323:1457.

42. Carnevale A, Lieberman E, Cárdenas R. Li-Fraumeni syndrome in pediatric patients with soft tissue sarcoma or osteosarcoma. Arch Med Res 1997; 28:383.

43. Cascão, R.; Moura, R.A.; Perpétuo, I.; Canhão, H.; Vieira-Sousa, E.; Mourão, A.F.; Rodrigues, A.M.; Polido-Pereira, J.; Queiroz, M.V.; Rosário, H.S. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2010, 12, 1–8.

44. *Chemin, K.; Pollastro, S.; James, E.; Ge, C.; Albrecht, I.; Herrath, J.; Gerstner, C.; Tandre, K.; Sampaio Rizzi, T.*; Rönnblom, L. A Novel HLA–DRB1* 10: 01–Restricted T Cell Epitope from Citrullinated Type II Collagen Relevant to Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2016, 68, 1124–1135.

45. *Chen X, Bahrami A, Pappo A, et al.* Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. Cell Rep 2014; 7:104.

46. *Chen X, Stewart E, Shelat AA, et al.* Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Cell 2013; 24:710.

47. *Cheuk W, Li PC, Chan JK.* Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumour: a distinctive mesenchymal tumour of immunocompromised individuals. Pathology 2002;34:245.

48. *Cho, B.-A.; Sim, J.H.; Park, J.A.; Kim, H.W.; Yoo, W.-H.; Lee, S.-H.; Lee, D.-S.; Kang, J.S.; Hwang, Y.-I.; Lee, W.J.* Characterization of effector memory CD8+ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis. J. Clin. Immunol. 2012, 32, 709–720.

49. *Ciechomska, M.; Roszkowski, L.; Maslinski, W.* DNA methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis. Cells 2019, 8, 953.

50. *Consortium, W.T.C.C.* Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. Nature 2007, 447, 661–678.

51. *Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, et al.* Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. Cancer Res 1994; 54:794.

52. *Curtis, J.R.; Singh, J.A.* Use of biologics in rheumatoid arthritis: Current and emerging paradigms of care. Clin. Ther. 2011, 33, 679–707.

53. *Darrah, E.; Giles, J.T.; Ols, M.L.; Bull, H.G.; Andrade, F.; Rosen, A.* Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. Sci. Transl. Med. 2013, 5, 186ra65.

54. *Daskalakis, M.; Brocks, D.; Sheng, Y.H.; Islam, M.S.; Ressnerova, A.; Assenov, Y.; Milde, T.; Oehme, I.; Witt, O.; Goyal, A.; et al.* Reactivation of endogenous retroviral elements via treatment with DNMT- and HDAC-inhibitors. Cell Cycle 2018, 17, 811–822.

55. *De Brito Rocha, S.; Baldo, D.C.; Andrade, L.E.C.* Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. Adv. Rheumatol. 2019, 59, 1–13.

56. *de la Calle-Fabregat, C.; Niemantsverdriet, E.; Cañete, J.D.; Li, T.; van der Helm-van Mil, A.H.M.; Rodríguez-Ubreva, J.; Ballestar, E.* The DNA methylation Profile of Undifferentiated Arthritis Patients Anticipates their Subsequent Differentiation to Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2021.

57. *De Raedt T, Beert E, Pasmant E, et al.* PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. Nature 2014; 514:247.

58. *DerKinderen DJ, Koten JW, Nagelkerke NJ, et al.* Non-ocular cancer in patients with hereditary retinoblastoma and their relatives. Int J Cancer 1988; 41:499.

59. *Derksen, V.; Huizinga, T.W.J.; van der Woude, D.* The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Semin. Immunopathol. 2017, 39, 437–446.

60. *Di Giovine, F.S.; Nuki, G.; Duff, G.W.* Tumour necrosis factor in synovial exudates. Ann. Rheum. Dis. 1988, 47, 768–772.

61. *Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 1992; 356:215.

62. *Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, et al.* Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. Cancer 1986; 57:2006.

63. *Dultz, G.; Matheis, N.; Dittmar, M.; Röhrig, B.; Bender, K.; Kahaly, G.J.* The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. Thyroid 2009, 19, 143–148.

64. *Ehrlich HP, Krummel TM.* Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. Wound Repair Regen. 1996 Apr-Jun;4(2):203–10.

65. *Eisenberg-Lerner, A.; Bialik, S.; Simon, H.-U.; Kimchi, A.* Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ. 2009, 16, 966–975.

66. *Ekwall, A.K.H.; Whitaker, J.W.; Hammaker, D.; Bugbee, W.D.; Wang, W.; Firestein, G.S.* The rheumatoid arthritis risk gene LBH regulates growth in fibroblast-like synoviocytes. Arthritis Rheumatol. 2015, 67, 1193–1202.

67. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75:817.

68. *Esberg, A.; Johansson, L.; Johansson, I.; Dahlqvist, S.R.* Oral Microbiota Identifies Patients in Early Onset Rheumatoid Arthritis. Microorganisms 2021, 9, 1657.

69. *Evans SC, Lozano G.* The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. Mol Med Today 1997; 3:390.

70. Farid, S.S.; Azizi, G.; Mirshafiey, A. Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. Int. J. Rheum. Dis. 2013, 16, 379–386.

71. *Fingerhut MA, Halperin WE, Marlow DA, et al.* Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. N Engl J Med 1991; 324:212.

72. *Firestein, G.S.* Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 2003, 423, 356–361.

73. *Firestein, G.S.; Yeo, M.; Zvaifler, N.J.* Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. J. Clin. Investig. 1995, 96, 1631–1638.

74. *Flørenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, et al.* MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. J Natl Cancer Inst 1994; 86:1297.

75. *Flynn RL, Cox KE, Jeitany M, et al.* Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. Science 2015; 347:273.

76. *Fragoulis, G.E.; McInnes, I.B.; Siebert, S.* JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis. Rheumatology 2019, 58, i43–i54.

77. Gaubitz M. Epidemiology of connective tissue disorders. Rheumatology (Oxford). 2006 Oct; 45 Suppl 3:iii3-4.

78. *Gianfrancesco, M.A.; Crowson, C.S.* Where There's Smoke, There's a Joint: Passive Smoking and Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2021.

79. *Gregersen, P.K.; Silver, J.; Winchester, R.J.* The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.1987, 30, 1205–1213.

80. *Grosso G, Bei R, Mistretta A, Marventano S, Calabrese G, Masuelli L, Giganti MG, Modesti A, Galvano F, Gazzolo D.* Effects of vitamin C on health: a review of evidence. Front Biosci (Landmark Ed). 2013 Jun 01; 18(3):1017–29.

81. *Guo, Q.; Wang, Y.; Xu, D.; Nossent, J.; Pavlos, N.J.; Xu, J.* Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. Bone Res. 2018, 6, 1–14.

82. *Hafkenscheid, L.; Bondt, A.; Scherer, H.U.; Huizinga, T.W.; Wuhrer, M.; Toes, R.E.; Rombouts, Y.* Structural analysis of variable domain glycosylation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis reveals the presence of highly sialylated glycans. Mol. Cell. Proteom. 2017, 16, 278–287.

83. *Halper J, Kjaer M.* Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. Adv Exp Med Biol. 2014; 802:31–47.

84. *Hardell L, Eriksson M.* The association between soft tissue sarcomas and exposure to phenoxyacetic acids. A new case-referent study. Cancer 1988; 62:652.

85. *Hartley AL, Birch JM, Blair V, et al.* Patterns of cancer in the families of children with soft tissue sarcoma. Cancer 1993; 72:923.

86. Hayakawa M, Kobayashi M, Hoshino T. Microfibrils: a constitutive component of reticular fibers in the mouse lymph node. Cell Tissue Res. 1990 Oct; 262(1):199–201.

87. Hedrich, C.M.; Tsokos, G.C. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Trends Mol. Med. 2011, 17, 714–724.

88. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. Caspian J Intern Med. 2011 Winter; 2(1):161–70.

89. *Herrath, J.; Chemin, K.; Albrecht, I.; Catrina, A.I.; Malmström, V.* Surface expression of CD39 identifies an enriched Treg-cell subset in the rheumatic joint, which does not suppress IL-17A secretion. Eur. J. Immunol. 2014, 44, 2979–2989.

90. *Hill, J.A.; Southwood, S.; Sette, A.; Jevnikar, A.M.; Bell, D.A.; Cairns, E.* Cutting edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. J. Immunol. 2003, 171, 538–541.

91. *Hizawa K, Iida M, Mibu R, et al.* Desmoid tumors in familial adenomatous polyposis/Gardner's syndrome. J Clin Gastroenterol 1997; 25:334.

92. *Hoffmann, A.; Zimmermann, C.A.; Spengler, D.* Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease. Front. Behav. Neurosci. 2015, 9, 120.

93. *Hoppin JA, Tolbert PE, Herrick RF, et al.* Occupational chlorophenol exposure and soft tissue sarcoma risk among men aged 30-60 years. Am J Epidemiol 1998; 148:693.

94. *Huber, L.C.; Brock, M.; Hemmatazad, H.; Giger, O.T.; Moritz, F.;* Trenkmann, M.; Distler, J.H.; Gay, R.E.; Kolling, C.; Moch, H. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Arthritis Rheum. 2007, 56, 1087–1093.

95. *Humphreys, J.H.; Verheul, M.K.; Barton, A.; MacGregor, A.J.; Lunt, M.; Toes, R.E.; Symmons, D.P.; Trouw, L.A.; Verstappen, S.M.* Anticarbamylated protein antibodies are associated with long-term disability and increased disease activity in patients with early inflammatory arthritis: Results from the Norfolk Arthritis Register. Ann. Rheum. Dis. 2016, 75, 1139–1144.

96. *Inagaki, M.; Takahara, H.; Nishi, Y.; Sugawara, K.; Sato, C.* Ca2+-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. J. Biol. Chem. 1989, 264, 18119–18127.

97. *Ingegnoli, F.; Castelli, R.; Gualtierotti, R.* Rheumatoid factors: Clinical applications. Dis. Markers 2013, 35, 727–734.

98. *Italiano A, Bianchini L, Keslair F, et al.* HMGA2 is the partner of MDM2 in welldifferentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. Int J Cancer 2008; 122:2233.

99. *Italiano A, Di Mauro I, Rapp J, et al.* Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): a prospective, multicentre, observational study. Lancet Oncol 2016; 17:532.

100. *Jonsson, T.; Arinbjarnarson, S.; Thorsteinsson, J.; Steinsson, K.; Geirsson, A.; Jonsson, H.; Valdimarsson, H.* Raised IgA rheumatoid factor (RF) but not IgM RF or IgG RF is associated with extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheumatol. 1995, 24, 372–375.

101. *Jónsson, T.; Steinsson, K.; Jónsson, H.; Geirsson, A.; Thorsteinsson, J.; Valdimarsson, H.* Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. 1998, 18, 119–122.

102. *Juno, J.A.; van Bockel, D.; Kent, S.J.; Kelleher, A.D.; Zaunders, J.J.; Munier, C.* Cytotoxic CD4 T cells—Friend or foe during viral infection? Front. Immunol. 2017, 8, 19.

103. *Kagohara, L.T.; Stein-O'Brien, G.L.; Kelley, D.; Flam, E.; Wick, H.C.; Danilova, L.V.; Easwaran, H.; Favorov, A.V.; Qian, J.; Gaykalova, D.A.* Epigenetic regulation of gene expression in cancer: Techniques, resources and analysis. Brief. Funct. Genom. 2018, 17, 49–63.

104. *Kampstra, A.S.B.; Dekkers, J.S.; Volkov, M.; Dorjée, A.L.; Hafkenscheid, L.; Kempers, A.C.; van Delft, M.; Kissel, T.; Reijm, S.; Janssen, G.M.C.; et al.* Different classes of anti-modified protein antibodies are induced on exposure to antigens expressing only one type of modification. Ann. Rheum. Dis. 2019, 78, 908–916.

105. *Kannus P.* Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports. 2000 Dec; 10(6):312–20.

106. *Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, et al.* Amplification of the CDK4 gene in sarcomas: tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. Anticancer Res 1998;18:2317.

107. *Karpeh MS, Brennan MF, Cance WG, et al.* Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in adult soft-tissue sarcomas. Br J Cancer 1995; 72:986.

108. *Kashtan CE. Alport Syndrome.* In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviewsUniversity of Washington, Seattle; Seattle (WA): Aug 28, 2001.

109. *Kato, M.; Ospelt, C.; Gay, R.E.; Gay, S.; Klein, K.* Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheumatol. 2014, 66, 40–48.

110. *Kaushik, S.; Cuervo, A.* Autophagy as a cell-repair mechanism: Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. Mol. Asp. Med. 2006, 27, 444–454.

111. *Kempers, A.C.; Hafkenscheid, L.; Scherer, H.U.; Toes, R.E.* Variable domain glycosylation of ACPA-IgG: A missing link in the maturation of the ACPA response? Clin. Immunol. 2018, 186, 34–37.

112. *Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, et al.* Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. Cancer Res 1993; 53:5535.

113. *Kleinerman RA, Tucker MA, Abramson DH, et al.* Risk of soft tissue sarcomas by individual subtype in survivors of hereditary retinoblastoma. J Natl Cancer Inst 2007; 99:24.

114. *Kleinerman RA, Tucker MA, Tarone RE, et al.* Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. J Clin Oncol 2005; 23:2272.

115. *Kogevinas M, Becher H, Benn T, et al.* Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. Am J Epidemiol 1997; 145:1061.

116. *Korb, A.; Pavenstädt, H.; Pap, T.* Cell death in rheumatoid arthritis. Apoptosis 2009, 14, 447–454.

117. *Ladanyi M, Bridge JA.* Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. Hum Pathol 2000; 31:532.

118. *Lander JJ, Stanley RJ, Sumner HW, et al.* Angiosarcoma of the liver associated with Fowler's solution (potassium arsenite). Gastroenterology 1975; 68:1582.

119. *Lane DP.* Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 1992; 358:15.

120. *Last JA, Reiser KM.* Collagen biosynthesis. Environ Health Perspect. 1984 Apr; 55:169–77.

121. *Leach FS, Tokino T, Meltzer P, et al.* p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. Cancer Res 1993; 53:2231.

122. *Lee ES, Locker J, Nalesnik M, et al.* The association of Epstein-Barr virus with smoothmuscle tumors occurring after organ transplantation. N Engl J Med 1995; 332:19.

123. *Lee JM, Abrahamson JL, Kandel R, et al.* Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. Oncogene 1994; 9:3731.

124. *Lee W, Teckie S, Wiesner T, et al.* PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. Nat Genet 2014; 46:1227.

125. *Lefèvre, S.; Knedla, A.; Tennie, C.; Kampmann, A.; Wunrau, C.; Dinser, R.; Korb, A.; Schnäker, E.-M.; Tarner, I.H.; Robbins, P.D.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nat. Med.2009, 15, 1414–1420.

126. *Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al.* The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. Br J Cancer 1994; 69:409.

127. *Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds.Cancer Res 1988; 48:5358.

128. *Li FP.* Cancer families: human models of susceptibility to neoplasia--the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. Cancer Res 1988; 48:5381.

129. *Li, B.; Carey, M.; Workman, J.L.* The role of chromatin during transcription. Cell 2007, 128, 707–719.

130. *Li, J.; Hsu, H.C.; Ding, Y.; Li, H.; Wu, Q.; Yang, P.; Luo, B.; Rowse, A.L.; Spalding, D.M.; Bridges, S.L., Jr.* Inhibition of Fucosylation Reshapes Inflammatory Macrophages and Suppresses Type II Collagen–Induced Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2014, 66, 2368–2379.

131. *Li, R.-F.; Chen, G.; Ren, J.-G.; Zhang, W.; Wu, Z.-X.; Liu, B.; Zhao, Y.; Zhao, Y.-F.* The adaptor protein p62 is involved in RANKL-induced autophagy and osteoclastogenesis. J. Histochem. Cytochem. 2014, 62, 879–888.

132. *Liau JY, Lee JC, Tsai JH, et al.* Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. Mod Pathol 2015; 28:1545.

133. *Lin, N.-Y.; Beyer, C.; Gießl, A.; Kireva, T.; Scholtysek, C.; Uderhardt, S.; Munoz,* L.E.; Dees, C.; Distler, A.; Wirtz, S. Autophagy regulates TNFα-mediated joint destruction in experimental arthritis. Ann. Rheum. Dis.2013, 72, 761–768.

134. *Liu, H.; Li, R.; Liu, T.; Yang, L.; Yin, G.; Xie, Q.* Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. Front. Immunol. 2020, 11, 1912.

135. *Liu, H.; Pope, R.M.* The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. Curr. Opin. Pharmacol. 2003, 3, 317–322.

136. *Llanos S, Efeyan A, Monsech J, et al.* A high-throughput loss-of-function screening identifies novel p53 regulators. Cell Cycle 2006; 5:1880.

137. Loebel C, Burdick JA. Engineering Stem and Stromal Cell Therapies for Musculoskeletal Tissue Repair. Cell Stem Cell. 2018 Mar 01; 22(3):325–339.

138. *Lopez-Santalla, M.; Fernandez-Perez, R.; Garin, M.I.* Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Rheumatoid Arthritis Treatment: An Update on Clinical Applications. Cells 2020, 9, 1852.

139. *Lundberg, K.; Nijenhuis, S.; Vossenaar, E.R.; Palmblad, K.; van Venrooij, W.J.; Klareskog, L.; Zendman, A.J.; Harris, H.E.* Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. Arthritis Res. 2005, 7, R458–R467.

140. *Luque-Campos, N.; Contreras-López, R.A.; Jose Paredes-Martínez, M.; Torres, M.J.; Bahraoui, S.; Wei, M.; Espinoza, F.; Djouad, F.; Elizondo-Vega, R.J.; Luz-Crawford, P.* Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. Front. Immunol. 2019, 10, 798.

141. *Lykkesfeldt J, Michels AJ, Frei B. Vitamin C.* Adv Nutr. 2014 Jan 01; 5(1):16-8.

142. *Mackie, S.L.; Vital, E.M.; Ponchel, F.; Emery, P.* Co-stimulatory blockade as therapy for rheumatoid arthritis. Curr. Rheumatol. Rep. 2005, 7, 400–406.

143. *Mai PL, Best AF, Peters JA, et al.* Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. Cancer 2016; 122:3673.

144. *Malemud, C.J.* Intracellular signaling pathways in rheumatoid arthritis. J. Clin. Cell. Immunol. 2013, 4, 160.

145. *Malemud, C.J.* The role of the JAK/STAT signal pathway in rheumatoid arthritis. Ther. Adv. Musculoskelet. Dis. 2018, 10, 117–127.

146. *Malkin D, Jolly KW, Barbier N, et al.* Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. N Engl J Med 1992; 326:1309.

147. *Malkin D.* p53 and the Li-Fraumeni syndrome. Cancer Genet Cytogenet 1993; 66:83.

148. *Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, Fassier F, Fratzl-Zelman N, Kozloff KM, Krakow D, Montpetit K, Semler O.* Osteogenesis imperfecta. Nat Rev Dis Primers. 2017 Aug 18; 3:17052.

149. *Martin GA, Viskochil D, Bollag G, et al.* The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. Cell 1990; 63:843.

150. *Martins-Green M, Boudreau N, Bissell MJ.* Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. Cancer Res 1994; 54:4334.

151. *McClain KL, Leach CT, Jenson HB, et al.* Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. N Engl J Med 1995; 332:12

152. *McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, et al.* Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. J Clin Oncol 1994; 12:925.

153. *Meijer, A.J.; Codogno, P.* Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. Mol. Asp. Med.2006, 27, 411–425.

154. *Mejbri, M.; Theodoropoulou, K.; Hofer, M.; Cimaz, R.* Interleukin-1 Blockade in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. Paediatr. Drugs 2020, 22, 251–262.

155. *Mertens F, Rydholm A, Bauer HF, et al.* Cytogenetic findings in malignant peripheral nerve sheath tumors. Int J Cancer 1995; 61:793.

156. *Mescher AL.* Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. Regeneration (Oxf). 2017 Apr; 4(2):39-53.

157. *Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Tsukamoto, H.; Ueda, N.* Molecular mechanisms of action of anti-TNF-α agents – Comparison among therapeutic TNF-α antagonists. Cytoki ne 2018, 101, 56–63.

158. *Mohamed AN, Zalupski MM, Ryan JR, et al.* Cytogenetic aberrations and DNA ploidy in soft tissue sarcoma. A Southwest Oncology Group Study. Cancer Genet Cytogenet 1997; 99:45.

159. *Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al.* The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 1992; 69:1237.

160. *Montaseri, A.; Giampietri, C.; Rossi, M.; Riccioli, A.; Fattore, A.D.; Filippini, A.* The Role of Autophagy in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Function. Biom olecules 2020, 10, 1398.

161. *Moots, R.J.; Xavier, R.M.; Mok, C.C.; Rahman, M.U.; Tsai, W.C.; Al-Maini, M.H.; Pavelka, K.; Mahgoub, E.; Kotak, S.; Korth-Bradley, J.; et al.* The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-interventional study. PLoS ONE 2017, 12, e0175207.

162. *Morinobu, A.* JAK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. Immunol. Med. 2020, 43, 148–155.

163. *Muller R, Hajdu SI, Brennan MF.* Lymphangiosarcoma associated with chronic filarial lymphedema. Cancer 1987; 59:179.

164. *Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scrable HJ, Cavenee WK.* Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87:5863.

165. Murata, K.; Ito, H.; Hashimoto, M.; Murakami, K.; Watanabe, R.; Tanaka, M.; Yamamoto, W.; Matsuda, S. Fluctuation in anti-cyclic citrullinated protein antibody level predicts relapse from remission in rheumatoid arthritis: KURAMA cohort. Arthritis Res. Ther. 2020, 22, 1–10.

166. Nair, N.; Barton, A.; Wilson, A.G. Cell-specific epigenetic drivers of pathogenesis in rheumatoid arthritis. Epigenomics 2021, 13, 549–560.

167. *Nakano, K.; Boyle, D.L.; Firestein, G.S.* Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. J. Immunol. 2013, 190, 1297–1303

168. *Nakano, K.; Whitaker, J.W.; Boyle, D.L.; Wang, W.; Firestein, G.S.* DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2013, 72, 110–117.

169. *Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, et al.* A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. Cell 2006; 126:503.

170. *Nedjic, J.; Aichinger, M.; Emmerich, J.; Mizushima, N.; Klein, L.* Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. Nature 2008, 455, 396–400.

171. *Nemtsova, M.V.; Zaletaev, D.V.; Bure, I.V.; Mikhaylenko, D.S.; Kuznetsova, E.B.; Alekseeva, E.A.; Beloukhova, M.I.; Deviatkin, A.A.; Lukashev, A.N.; Zamyatnin, A.A., Jr.* Epigenetic changes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Front. Genet. 2019, 10, 570.

172. *Nilbert M, Rydholm A, Willén H, et al.* MDM2 gene amplification correlates with ring chromosome in soft tissue tumors. Genes Chromosomes Cancer 1994; 9:261.

173. *Nimmerjahn, F.; Ravetch, J.V.* Fc-receptors as regulators of immunity. Adv. Immunol. 2007, 96, 179–204.

174. N*orin, U.; Rintisch, C.; Meng, L.; Forster, F.; Ekman, D.; Tuncel, J.; Klocke, K.; Bäcklund, J.; Yang, M.; Bonner, M.Y.* Endophilin A2 deficiency protects rodents from autoimmune arthritis by modulating T cell activation. Nat. Commun. 2021, 12, 1–11.

175. *Ogawa M, Larue AC, Watson PM, Watson DK.* Hematopoietic stem cell origin of connective tissues. Exp Hematol. 2010 Jul; 38(7):540–7.

176. *Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P.* Sarcomas in TP53 germline mutationcarriers: a review of the IARC TP53 database. Cancer 2012; 118:1387.

177. *Ohmi, Y.; Ise, W.; Harazono, A.; Takakura, D.; Fukuyama, H.; Baba, Y.; Narazaki, M.; Shoda, H.; Takahashi, N.; Ohkawa, Y.* Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. Nat. Commun. 2016, 7, 1–12.

178. *Okada, Y.; Terao, C.; Ikari, K.; Kochi, Y.; Ohmura, K.; Suzuki, A.; Kawaguchi, T.; Stahl, E.A.; Kurreeman, F.A.; Nishida, N.* Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nat. Genet. 2012, 44, 511.

179. *Okada, Y.; Wu, D.; Trynka, G.; Raj, T.; Terao, C.; Ikari, K.; Kochi, Y.; Ohmura, K.; Suzuki, A.; Yoshida, S.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature 2014, 506, 376–381.

180. *Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, et al.* Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature 1992; 358:80.

181. *Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al.* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. Nature 1993; 362:857.

182. *Pachnio, A.; Ciaurriz, M.; Begum, J.; Lal, N.; Zuo, J.; Beggs, A.; Moss, P.* Cytomegalovirus infection leads to development of high frequencies of cytotoxic virus-specific CD4+ T cells targeted to vascular endothelium. PLoS Pathog. 2016, 12, e1005832.

183. *Pap, T.; Müller-Ladner, U.; Gay, R.E.; Gay, S.* Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2000, 2, 1–7.

184. *Patterson H, Gill S, Fisher C, et al.* Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. Br J Cancer 1994; 69:1052.

185. *Payandeh, Z.; Bahrami, A.A.; Hoseinpoor, R.; Mortazavi, Y.; Rajabibazl, M.; Rahimpour, A.; Taromchi, A.H.; Khalil, S.* The applications of anti-CD20 antibodies to treat various B cells disorders. Biomed. Pharmacother. 2019, 109, 2415–2426.

186. *Pilotti S, Della Torre G, Lavarino C, et al.* Molecular abnormalities in liposarcoma: role of MDM2 and CDK4-containing amplicons at 12q13-22. J Pathol 1998; 185:188.

187. *Pinnell SR.* Regulation of collagen synthesis. J Invest Dermatol. 1982 Jul; 79 Suppl 1:73s-76s.

188. *Pollock R, Lang A, Ge T, et al.* Wild-type p53 and a p53 temperature-sensitive mutant suppress human soft tissue sarcoma by enhancing cell cycle control. Clin Cancer Res1998; 4:1985.

189. *Pollock RE, Lang A, Luo J, et al.* Soft tissue sarcoma metastasis from clonal expansion of p53 mutated tumor cells. Oncogene 1996; 12:2035.

190. *Polson, A.G.; Zheng, B.; Elkins, K.; Chang, W.; Du, C.; Dowd, P.; Yen, L.; Tan, C.; Hongo, J.A.; Koeppen, H.; et al.* Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. Int. Immunol. 2006, 18, 1363–1373.

191. *Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD.* Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. Am J Pathol 1992; 140:145.

192. *Purgina B, Rao UN, Miettinen M, Pantanowitz L.* AIDS-Related EBV-Associated Smooth Muscle Tumors: A Review of 64 Published Cases. Patholog Res Int 2011; 2011:561548.

193. *Radner, H.; Aletaha, D.* Anti-TNF in rheumatoid arthritis: An overview. Wien. Med. Wochenschr. 2015, 165, 3–9.

194. Raimondo, M.G.; Biggioggero, M.; Crotti, C.; Becciolini, A.; Favalli, E.G. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. Drug Des. Dev. Ther. 2017, 11, 1593–1603.

195. *Reed, E.; Hedström, A.K.; Hansson, M.; Mathsson-Alm, L.; Brynedal, B.; Saevarsdottir, S.; Cornillet, M.; Jakobsson, P.-J.; Holmdahl, R.; Skriner, K.* Presence of autoantibodies in «seronegative» rheumatoid arthritis associates with classical risk factors and high disease activity. Arthritis Res. Ther. 2020, 22, 1–11.

196. *Reily, C.; Stewart, T.J.; Renfrow, M.B.; Novak, J.* Glycosylation in health and disease. Nat. Rev. Nephrol.2019, 15, 346–366.

197. *Reyes-Castillo, Z.; Muñoz-Valle, J.F.; Llamas-Covarru*bias, M.A. Clinical and immunological aspects of anti-peptidylarginine deiminase type 4 (anti-PAD4) autoantibodies in rheumatoid arthritis. Autoimmun. Rev.2018, 17, 94–102.

198. *Rhead, B.; Holingue, C.; Cole, M.; Shao, X.; Quach, H.L.; Quach, D.; Shah, K.; Sinclair, E.; Graf, J.; Link, T.* Rheumatoid arthritis naive T cells share hypermethylation sites with synoviocytes. Arthritis Rheumatol.2017, 69, 550–559.

199. *Ricard-Blum S.* The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 01; 3(1):a004978.

200. *Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S.D.; et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N. Engl. J. Med. 2017, 377, 1119–1131.

201. *Rieck, M.; Arechiga, A.; Onengut-Gumuscu, S.; Greenbaum, C.; Concannon, P.; Buckner, J.H.* Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. J. Immunol. 2007, 179, 4704–4710.

202. *Sahlström, P.; Hansson, M.; Steen, J.; Amara, K.; Titcombe, P.J.; Forsström, B.; Stålesen, R.; Israelsson, L.; Piccoli, L.; Lundberg, K.; et al.* Different Hierarchies of Anti-Modified Protein Autoantibody Reactivities in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2020, 72, 1643–1657.

203. *Satoskar, R.; Shah, S.; Shenoy, S.* Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1986, 24, 651–654.

204. *Scherer, H.U.; Huizinga, T.W.; Krönke, G.; Schett, G.; Toes, R.E.* The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. Nat. Rev. Rheumatol. 2018, 14, 157.

205. *Schett, G.; Tohidast-Akrad, M.; Smolen, J.S.; Schmid, B.J.; Steiner, C.W.; Bitzan, P.; Zenz, P.; Redlich, K.; Xu, Q.; Steiner, G.* Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal–regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol. 2000, 43, 2501–2512.

206. *Schmidt, D.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M.* CD4+ CD7-CD28-T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. J. Clin. Investig. 1996, 97, 2027–2037.

207. *Schuebel, K.; Gitik, M.; Domschke, K.; Goldman, D. Making sense of epigenetics. Int. J.* Neuropsychopharmacol. 2016, 19, pyw058.

208. *Seeling, M.; Brückner, C.; Nimmerjahn, F.* Differential antibody glycosylation in autoimmunity: Sweet biomarker or modulator of disease activity? Nat. Rev. Rheumatol. 2017, 13, 621–630.

209. *Seto, E.; Yoshida, M.* Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014, 6, a018713.

210. *Shakibaei, M.; Buhrmann, C.; Kraehe, P.; Shayan, P.; Lueders, C.; Goel, A.* Curcumin chemosensitizes 5-fluorouracil resistant MMR-deficient human colon cancer

cells in high density cultures. PLoS ONE 2014, 9, e85397.

211. *Shakibaei, M.; John, T.; Schulze-Tanzil, G.; Lehmann, I.; Mobasheri, A.* Suppression of NF-κB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. Biochem. Pharmacol. 2007, 73, 1434–1445.

212. *Shekhter AB.* Connective tissue as an integral system: role of cell-cell and cell-matrix interactions. Connect Tissue Res. 1986; 15(1-2):23–31.

213. *Sheppard, M.; Laskou, F.; Stapleton, P.P.; Hadavi, S.; Dasgupta, B.* Tocilizumab (Actemra). Hum. Vaccines Immunother. 2017, 13, 1972–1988.

214. *Shern JF, Chen L, Chmielecki J, et al.* Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. Cancer Discov 2014; 4:216.

215. *Shi, J.; Knevel, R.; Suwannalai, P.; van der Linden, M.P.; Janssen, G.M.; van Veelen, P.A.; Levarht, N.E.; van der Helm-van, A.H.; Cerami, A.; Huizinga, T.W.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA2011, 108, 17372–17377.

216. *Shi, J.; van de Stadt, L.A.; Levarht, E.; Huizinga, T.; Toes, R.; Trouw, L.A.; van Schaardenburg, D.* Anti Carbamylated Protein Antibodies (anti-CarP) are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2012, 21, 37830.

217. *Shi, J.; van de Stadt, L.A.; Levarht, E.N.; Huizinga, T.W.; Hamann, D.; van Schaardenburg, D.; Toes, R.E.; Trouw, L.A.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2014, 73, 780–783.

218. *Shi, J.; van Steenbergen, H.W.; van Nies, J.A.; Levarht, E.W.; Huizinga, T.W.; van der Helm-van Mil, A.H.; Toes, R.E.; Trouw, L.A.* The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. Arthritis Res. 2015, 17, 339.

219. *Shin, Y.-J.; Han, S.-H.; Kim, D.-S.; Lee, G.-H.; Yoo, W.-H.; Kang, Y.-M.; Choi, J.-Y.; Lee, Y.C.; Park, S.J.; Jeong, S.-K.* Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. Arthritis Res. Ther. 2010, 12, 1–11.

220. *Shinkawa, T.; Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M.* The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Biol. Chem. 2003, 278, 3466–3473.

221. *Sidney, J.; Becart, S.; Zhou, M.; Duffy, K.; Lindvall, M.; Moore, E.C.; Moore, E.L.; Rao, T.; Rao, N.; Nielsen, M.; et al.* Citrullination only infrequently impacts peptide binding to HLA class II MHC. PLoS ONE 2017, 12, e0177140.

222. *Sieghart, D.; Platzer, A.; Studenic, P.; Alasti, F.; Grundhuber, M.; Swiniarski, S.; Horn, T.; Haslacher, H.; Blüml, S.; Smolen, J.* Determination of autoantibody isotypes increases the sensitivity of serodiagnostics in rheumatoid arthritis. Front. Immunol. 2018, 9, 876.

223. *Sieweke MH, Thompson NL, Sporn MB, Bissell MJ. Mediatio*n of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta. Science 1990; 248:1656.

224. *Simms WW, Ordóñez NG, Johnston D, et al.* p53 expression in dedifferentiated chondrosarcoma. Cancer 1995; 76:223.

225. *Smolen, J.S.; Landewé, R.B.M.; Bijlsma, J.W.J.; Burmester, G.R.; Dougados, M.; Kerschbaumer, A.; McInnes, I.B.; Sepriano, A.; van Vollenhoven, R.F.; de Wit, M.; et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. Ann. Rheum. Dis. 2020, 79, 685–699.

226. *Soini Y, Vähäkangas K, Nuorva K, et al.* p53 immunohistochemistry in malignant fibrous histiocytomas and other mesenchymal tumours. J Pathol 1992; 168:29.

227. *Sokolove, J.; Johnson, D.S.; Lahey, L.J.; Wagner, C.A.; Cheng, D.; Thiele, G.M.; Michaud, K.; Sayles, H.; Reimold, A.M.; Caplan, L.* Rheumatoid factor as a potentiator of anti–citrullinated protein antibody–mediated inflammation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol. 2014, 66, 813–821.

228. *Song, Y.; Kang, E.* Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. QJM Int. J. Med. 2010, 103, 139–146.

229. *Stahl, E.A.; Raychaudhuri, S.; Remmers, E.F.; Xie, G.; Eyre, S.; Thomson, B.P.; Li, Y.; Kurreeman, F.A.; Zhernakova, A.; Hinks, A.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nat. Genet. 2010, 42, 508.

230. *Stastny, P.* Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 1978, 298, 869–871.

231. *Steen, J.; Forsström, B.; Sahlström, P.; Odowd, V.; Israelsson, L.; Krishnamurthy, A.; Badreh, S.; Mathsson Alm, L.; Compson, J.; Ramsköld, D.; et al.* Recognition of Amino Acid Motifs, Rather Than Specific Proteins, by Human Plasma Cell-Derived Monoclonal Antibodies to Posttranslationally Modified Proteins in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2019, 71, 196–209.

232. *Stewart FW, Treves N.* Classics in oncology: lymphangiosarcoma in postmastectomy lymphedema: a report of six cases in elephantiasis chirurgica. CA Cancer J Clin 1981; 31:284.

233. *Stratton MR, Moss S, Warren W, et al.* Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. Oncogene 1990; 5:1297.

234. *Suzuki, A.; Yamada, R.; Chang, X.; Tokuhiro, S.; Sawada, T.; Suzuki, M.; Nagasaki, M.; Nakayama-Hamada, M.; Kawaida, R.; Ono, M.; et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat. Genet. 2003, 34, 395–402.

235. *Syed Mohamed Suhail, S.M.; Nur Atiqah, I.; Nur Salimi Zakirah, Z.A.; Lailatul Syazwani, Z.; Batis, W.W.; Md Monoto, E.M.; Abdul Wahab, A.; Mohd Shahrir, M.S.* Diagnostic performance of anti-RA33 antibody as a serological marker for rheumatoid arthritis. Malays. J. Pathol. 2019, 41, 259–265.

236. *Tanaka, H.; Muto, A.; Shima, H.; Katoh, Y.; Sax, N.; Tajima, S.; Brydun, A.; Ikura, T.; Yoshizawa, N.; Masai, H.* Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene (Prdm1) in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. J. Biol. Chem. 2016, 291, 6316–6330.

237. *Tarcsa, E.; Marekov, L.N.; Mei, G.; Melino, G.; Lee, S.C.; Steinert, P.M.* Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. J. Biol. Chem. 1996, 271, 30709–30716.

238. The association of selected cancers with service in the US military in Vietnam. II. Soft tissue and other sarcomas. The Selected Cancers Cooperative Study Group. Arch Intern Med 1990; 150:2485.

239. *Thome, J.J.; Yudanin, N.; Ohmura, Y.; Kubota, M.; Grinshpun, B.; Sathaliyawala, T.; Kato, T.; Lerner, H.; Shen, Y.; Farber, D.L.* Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. Cell 2014, 159, 814–828.

240. *Tilvawala, R.; Nguyen, S.H.; Maurais, A.J.; Nemmara, V.V.; Nagar, M.; Salinger, A.J.; Nagpal, S.; Weerapana, E.; Thompson, P.R.* The Rheumatoid Arthritis-Associated Citrullinome. Cell Chem. Biol. 2018, 25, 691–704.e696.

241. *Toguchida J, Yamaguchi T, Dayton SH, et al.* Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. N Engl J Med 1992; 326:1301.

242. *Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, et al.* Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. Cancer Res 1992; 52:6194.

243. *Tomita K, Yokogawa A, Oda Y, Terahata S.* Lymphangiosarcoma in postmastectomy lymphedema (Stewart-Treves syndrome): ultrastructural and immunohistologic characteristics. J Surg Oncol 1988; 38:275.

244. *Topper, M.J.; Vaz, M.; Marrone, K.A.; Brahmer, J.R.; Baylin, S.B.* The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2020, 17, 75–90.

245. *Tsai, C.Y.; Hsieh, S.C.; Liu, C.W.; Lu, C.H.; Liao, H.T.; Chen, M.H.; Li, K.J.; Wu, C.H.; Shen, C.Y.; Kuo, Y.M.; et al.* The Expression of Non-Coding RNAs and Their Target Molecules in Rheumatoid Arthritis: A Molecular Basis for Rheumatoid Pathogenesis and Its Potential Clinical Applications. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 5689.

246. *Uitto J.* Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. J Invest Dermatol. 1979 Jan; 72(1):1–10.

247. *Umeda, N.; Matsumoto, I.; Kawaguchi, H.; Kurashima, Y.; Kondo, Y.; Tsuboi, H.; Ogishima, H.; Suzuki, T.; Kagami, Y.; Sakyu, T.* Prevalence of soluble peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and anti-PAD4 antibodies in autoimmune diseases. Clin. Rheumatol. 2016, 35, 1181–1188.

248. *Valesini, G.; Gerardi, M.C.; Iannuccelli, C.; Pacucci, V.A.; Pendolino, M.; Shoenfeld, Y.* Citrullination and autoimmunity. Autoimmun. Rev. 2015, 14, 490–497.

249. *Van Delft, M.A.M.; Huizinga, T.W.J.* An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. J. Autoimmun.2020, 110, 102392.

250. *van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR, Pals G.* Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. Mol Syndromol. 2011 Dec; 2(1):1–20.

251. *Vang, T.; Congia, M.; Macis, M.D.; Musumeci, L.; Orrú, V.; Zavattari, P.; Nika, K.; Tautz, L.; Taskén, K.; Cucca, F.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. Nat. Genet.2005, 37, 1317–1319.

252. *Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al.* Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. Cancer Res 1997; 57:3245.

253. *Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature 2007; 445:661.

254. *Verheul, M.; Fearon, U.; Trouw, L.; Veale, D.* Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. Clin. Immunol. 2015, 161, 2–10.

255. *Vineis P, Faggiano F, Tedeschi M, Ciccone G.* Incidence rates of lymphomas and soft-tissue sarcomas and environmental measurements of phenoxy herbicides. J Natl Cancer Inst1991; 83:362.

256. *Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, et al.* Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. Science 1999; 286:2176.

257. *Vojinovic, J.; Damjanov, N.* HDAC inhibition in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. Mol. Med. 2011, 17, 397–403.

258. *Vomero, M.; Barbati, C.; Colasanti, T.; Perricone, C.; Novelli, L.; Ceccarelli, F.; Spinelli, F.R.; Di Franco, M.; Conti, F.; Valesini, G.* Autophagy and rheumatoid arthritis: Current knowledges and future perspectives. Front. Immunol. 2018, 9, 1577.

259. *Wada, T.T.; Araki, Y.; Sato, K.; Aizaki, Y.; Yokota, K.; Kim, Y.T.; Oda, H.; Kurokawa, R.; Mimura, T.* Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014, 444, 682–686.

260. *Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, et al.* p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. Br J Cancer 1993; 68:1134.

261. *Whitaker, J.W.; Shoemaker, R.; Boyle, D.L.; Hillman, J.; Anderson, D.; Wang, W.; Firestein, G.S.* An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. Genome Med. 2013, 5, 1–12.

262. *Willemze, A.; Trouw, L.A.; Toes, R.E.; Huizinga, T.W.* The influence of ACPA status and characteristics on the course of RA. Nat. Rev. Rheumatol. 2012, 8, 144–152.

263. *Wingren G, Fredrikson M, Brage HN, et al.* Soft tissue sarcoma and occupational exposures. Cancer 1990; 66:806.

264. *Wirawan, E.; Walle, L.V.; Kersse, K.; Cornelis, S.; Claerhout, S.; Vanoverberghe, I.; Roelandt, R.; De Rycke, R.; Verspurten, J.; Declercq, W.* Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. Cell Death Dis. 2010, 1, e18.

265. *Wong FL, Boice JD Jr, Abramson DH, et al.* Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. JAMA 1997; 278:1262.

266. *Wunder JS, Czitrom AA, Kandel R, Andrulis IL.* Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. J Natl Cancer Inst 1991; 83:194.

267. *Xu GF, Lin B, Tanaka K, et al.* The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of S. cerevisiae. Cell 1990; 63:835.

268. *Xu, K.; Xu, P.; Yao, J.-F.; Zhang, Y.-G.; Hou, W.-k.; Lu, S.-M.* Reduced apoptosis correlates with enhanced autophagy in synovial tissues of rheumatoid arthritis. Inflamm. Res. 2013, 62, 229–237.

269. *Yang CY, Liau JY, Huang WJ, et al.* Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. Am J Transl Res 2015; 7:2072.

270. *Yang, Z.; Goronzy, J.J.; Weyand, C.M.* Autophagy in autoimmune disease. J. Mol. Med. 2015, 93, 707–717.

271. *Yap, H.-Y.; Tee, S.Z.-Y.; Wong, M.M.-T.; Chow, S.-K.; Peh, S.-C.; Teow, S.-Y.* Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: Implications in clinical treatment and biomarker development. Cells 2018, 7, 161.

272. *Young RA.* The Ground Substance of Connective Tissue. J Physiol. 1894 May 29; 16(5-6):325–50.

273. *Yu CL, Tucker MA, Abramson DH, et al.* Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma. J Natl Cancer Inst 2009; 101:581.

274. *Zahm SH, Fraumeni JF Jr.* The epidemiology of soft tissue sarcoma. Semin Oncol 1997; 24:504.

275. *Zan, H.; Casali, P.* Epigenetics of peripheral B-cell differentiation and the antibody response. Front. Immunol. 2015, 6, 631.

276. *Zauner, G.; Selman, M.H.; Bondt, A.; Rombouts, Y.; Blank, D.; Deelder, A.M.; Wuhrer, M.* Glycoproteomic analysis of antibodies. Mol. Cell. Proteom. 2013, 12, 856–865.

277. *Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al.* Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. N Engl J Med 2015; 373:2336.

278. *Zhang M, Linardic CM, Kirsch DG.* RAS and ROS in rhabdomyosarcoma. Cancer Cell 2013; 24:689.

279. *Zhang, L.L.; Wu, X.X.; Wang, X.F.; Di, D.S.; Huang, Q.; Liu, R.S.; Shuai, Z.W.; Ye, D.Q.; Leng, R.X.* Genetic variant in microRNA-146a gene is associated with risk of rheumatoid arthritis. Ann. Med. 2021, 53, 824–829.

280. *Zhang, Q.; Cao, X.* Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. Nat. Rev. Immunol.2019, 19, 417–432.

281. *Zhang, X.; Zhang, D.; Jia, H.; Feng, Q.; Wang, D.; Liang, D.; Wu, X.; Li, J.; Tang, L.; Li, Y.; et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. Nat. Med.2015, 21, 895–905.

282. *Zhao, Y.; Chen, G.; Zhang, W.; Xu, N.; Zhu, J.Y.; Jia, J.; Sun, Z.J.; Wang, Y.N.; Zhao, Y.F.* Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1α/BNIP3 signaling pathway. J. Cell. Physiol. 2012, 227, 639–648.

283. *Zhu, L.; Wang, H.; Wu, Y.; He, Z.; Qin, Y.; Shen, Q.* The Autophagy Level Is Increased in the Synovial Tissues of Patients with Active Rheumatoid Arthritis and Is Correlated with Disease Severity. Mediat. Inflamm. 2017, 2017, 7623145.

Глава 7. Клиническая физиология высших функций мозга, или механизмы формирования и хранения памяти

П.М. Балабан

В настоящей работе не будет проводиться анализ различных форм нейропатологий, прежде всего потому, что на сегодняшний день ни одна патология нервной системы не излечивается, возможно только некоторое торможение развития таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. Причиной отсутствия эффективных лекарств является отсутствие полноценных знаний о работе нервных сетей мозга и глиальных клеток мозга в норме и при патологиях, отсутствие мишеней для лекарственных средств и неспецифичность проявлений заболеваний на уровне высших функций мозга. В этом разделе будет проведен анализ современных исследований механизмов пластичности и памяти как основного проявления высших функций мозга.

Введение

Первое, что с очевидностью изменяется при практически любой патологии, это проявление высших (когнитивных) функций мозга. Человек начинает иначе реагировать на окружение, меняются пороги восприятия, локомоция даже при простом ушибе пальца на ноге, не говоря уже об изменениях при небольшом повышении температуры. Но никакого участия в регуляции высших функций мозга ни ушиб, ни повышение температуры не имеют, хотя корреляции очевидны. При этом неспецифичность проявлений патологии в поведении также понятна и обоснована необходимостью адаптации к изменениям внешней и внутренней среды, но это свойство очень затрудняет фундаментальные исследования механизмов регуляции поведения животных и человека. Пластичность когнитивных проявлений функционирования мозга у человека огромна, поэтому для анализа механизмов изменений в норме и при патологиях выбирают такие формы поведения, которые можно легко описать операционально и объективно измерить показатели. Первым в этой области активно настаивал на использовании только объективно замеряемых показателей И.П. Павлов, что привело его последователей к ошибочному описанию поведения как состоящему из составных частей в виде рефлекторных реакций. Максимально часто для оценки когнитивных функций используют свойство нервной системы пластически реагировать на внешние стимулы – память.

Память является основным механизмом адаптации организма к меняющейся среде и улучшению эффективности поведения животных и человека. Любая патология памяти может быть фатальна для организма, поэтому исследования механизмов памяти на всех уровнях живого являются принципиально важными для клинической физиологии.

В настоящей работе не будет сделан анализ различных форм нейропатологий, прежде всего потому, что на сегодняшний день ни одна патология нервной системы не излечивается, возможно только некоторое торможение развития таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. Причиной отсутствия лекарств является отсутствие полноценных знаний о работе нервных сетей мозга и глиальных клеток мозга в норме и при патологиях, неспецифичность проявлений заболеваний на уровне высших функций мозга. В этом разделе будет проведен анализ современных исследований механизмов пластичности и памяти и будет сделана попытка ответить на следующие вопросы.

1. Эволюция памяти и поведения, или одинаковы ли свойства памяти у животных и человека.
2. Молекулярные механизмы формирования ассоциативной памяти, или существует ли таблетка для памяти.
3. Системные механизмы памяти, или какой размер минимальной нервной сети для формирования памяти.
4. Роль глии в формировании, воспроизведении и хранении памяти, или как медленная глия может участвовать в быстрых процессах.
5. Память и нейрогенетика, или как регуляция экспрессии генов в разных нейронах может быть основой формирования памяти.

1. Эволюция памяти и поведения, или одинаковы ли свойства памяти у животных и человека

Хорошо известно, что долговременные пластические изменения работы нервной системы характерны для всех животных, обладающих центральной нервной системой, и служат основой для адаптивного поведения, причем молекулярные механизмы пластичности в общих чертах сходны [1]. Основой пластических изменений служат глутаматергические синапсы и несколько видов рецепторов глутамата, причем молекулярная машинерия сходна от моллюсков до человека, хотя нервные клетки независимо возникали не один раз в ходе эволюции [2], [3]. Строение нервных сетей, роль разных анализаторов у разных животных может существенно отличаться, однако центральное звено пластичности очень похоже у всех животных, что не говорит о едином происхождении, а скорее указывает на очень эффективный механизм, используемый Природой для пластических процессов. На уровне поведения пластичность (память) проявляется в том, что при смене внешнего окружения меняется и поведение животного. Причем во всех случаях соблюдается принцип «минимизации деятельности», что выражается в уменьшении времени выполнения какой-либо задачи, сокращению пути к цели и т. д. Проявления памяти в поведении у всех животных и человека обычно выглядят как изменения реакции на внешние стимулы. Как это ни странно звучит, но можно сказать, что у всех животных, включая человека, есть всего 4 основные формы поведения (пищедобывательное, половое, оборонительное и поисковое), вариации которых и составляют поведение. В качестве примера «когнитивности» поведения головоногих моллюсков

можно привести способность мгновенно, в доли секунды, адаптировать локомоцию, цвет и форму тела с целью слиться с окружающим фоном только на основе зрительного изображения. Кальмары способны окрасить часть тела, обращенную к самке, в «позитивный» цвет, тогда как часть тела, обращенную вовне, окрасить в «боевой» отпугивающий окрас исходя из гипотезы, что где-то могут быть соперники. Примерно такие же выводы можно сделать и при рассмотрении пластичности и памяти у животных разного уровня филогенеза. Часто говорят, что искусство и близкие к нему формы поведения свойственны только человеку. Действительно, это так и есть, но если мы рассмотрим это поведение как часть поисково-исследовательского, то опять придем всего к 4 формам поведения, только разной сложности, приобретенной в ходе эволюции.

Эволюция пластических свойств нервной системы и поведения в животном мире рассматривается крайне редко, что может быть связано с тем, что для любого животного с центральной нервной системой можно подобрать экологически адекватные условия, в которых можно быстро обучить животное иначе реагировать на внешние стимулы. Основные условия для обучения связаны с видовыми ограничениями работы сенсорных органов и двигательной активности. Например, в глазах большей части видов брюхоногих моллюсков очень мало фоторецепторов и фактически идет просто различение света и темноты. Компенсируется это фоторецептивными клетками в коже по всему телу, которые в большинстве случаев реагируют на ослабление светового потока, что имитирует затенение при приближении хищника. В то же время у вторично наземных брюхоногих появилось в разы большее количество нейронов в области мозга, отвечающей за обоняние, чем во всем мозге, и выносные органы обоняния с хеморецепторами на кончиках щупалец, то есть эти животные живут в мире запахов.

Головоногие моллюски, сохранившие водный образ жизни, развили сравнимый с позвоночными по сложности и относительному размеру мозг и зрительный аппарат. На основе изображения, эти животные в доли секунды оценивают окружающую обстановку и адаптируют не только поведение ([4]), но и окраску и форму тела, что очень трудно не называть когнитивными формами поведения. К сожалению, трудности их содержания в лаборатории и очень сложная структура головного мозга затрудняют нейрофизиологические исследования на этих животных. В целом можно смело сказать, что усложнение поведения четко коррелирует с появлением уже не десятка, а сотен тысяч и миллионов нейронов даже у беспозвоночных животных, однако локальные молекулярные механизмы в синапсах или теле нейронов очень сходны у всех таксонов, независимо от эволюционного происхождения.

2. Молекулярные механизмы формирования ассоциативной памяти, или существует ли таблетка для памяти

Одинаковы ли известные молекулярные механизмы поведения и пластических характеристик у животных разного уровня филогенеза?

На сегодняшний день кандидатов на молекулярно-биохимические системы, специфические для формирования долговременной памяти, почти что и нет. Много усилий было потрачено на доказательство важной роли кальмодулина в формировании памяти [5], но роль этого фермента оказалась настолько многосторонней, что его безусловная важность для формирования пластических изменений в итоге не столь специфична. Значительно более специфична для памяти роль второй рассматриваемой как кандидат на «молекулу памяти» протеинкиназы Мзета, фермента, который «командует» системой из 5 белков, доставляющих в постсинаптическую мембрану глутаматные AMPA рецепторы [6], которые и определяют эффективность синаптической связи. Это атипичная форма постоянно активного фермента, которая находится непосредственно в синаптических контактах между нейронами и даже синтезируется прямо в синапсе, хотя обычно синтез белков идет в теле клетки. Если М-зета избирательно блокировать с помощью специфического белкового блокатора именно в тех нейронах, которые необходимы для данного вида памяти, то избирательно нарушается эта память, но все остальные функции сохраняются. Эксперименты, в которых это выяснилось, проводились на крысах. Через три месяца после однократного удара током на фоне предъявления неиндифферентного запаха крысам ввели в нужное место нервной системы (амигдала) специфический блокатор, и, когда сделали измерения поведения, оказалось, что экспериментальные крысы не воспринимают этот запах как опасный в отличие от контрольных животных [7]–[9]. При этом организм сохранил способность к обучению уже через небольшое время. Очень много экспериментов было сделано на разных животных, даже на брюхоногих моллюсках, и в результате у всех животных, имеющих нервную систему, нашлись гомологи протеинкиназы Мзета [10], [11]. У всех существ эти молекулы синтезируются прямо в контактах нервной системы, то есть там, где и должны происходить пластические изменения. Память можно сформировать за несколько часов, дней, и она хранится постоянно путем локального самовоспроизведения молекул этого фермента, сохраняя измененную в результате обучения локальную концентрацию этих молекул. Протеинкиназа М-зета на сегодняшний день главный кандидат на критический компонент памяти и является основой ее стабильности. Однако мы знаем, что среднее время жизни белковой молекулы всего 3-5 дней. То есть, если мы кодируем память с помощью белковых молекул, которые обновляются, мы можем хранить память днями, но никак не годами. Как же мы тогда помним, что случилось пять или десять лет назад? Выяснилось, что эти молекулы обладают уникальным свойством, характерным только для этой биохимической системы – самовоспроизведением. Каждая вновь образованная молекула включает механизм синтеза новой молекулы себе на смену, локально поддерживая изменения в данном месте нервной системы без ограничений по времени, то есть поддерживая память. Сегодня это единственная биохимическая ферментная система, специфически связанная с памятью.

В поведенческих экспериментах на виноградной улитке (*Helix lucorum*) в нашей лаборатории было убедительно показано, что введение пептидного блокатора РКМζ через день после обучения нарушает хранение памяти об обстановке, в которой улитку били током. Различия между реакциями

животного в разных обстановках полностью исчезают [12]. Важно отметить, что блокада PKMζ с одновременным запуском реконсолидации напоминанием об обстановке не приводит к исчезновению памяти, так как процессы, запускаемые реконсолидацией, длятся существенно дольше, чем действие пептидного блокатора, и синтезируются новые молекулы PKMζ [12].

В электрофизиологических экспериментах *in vitro* было также продемонстрировано, что блокатор PKMζ снимает проявления долговременной потенциации, если его применять через 90-120 мин. после тетанизации [12]. Полученные результаты полностью совпадают с данными на позвоночных животных и позволяют считать, что и феномен реконсолидации и механизм хранения памяти с помощью семейства атипичных киназ являются эволюционно консервативными и не зависят от структуры нервной системы.

Логично предположить, что увеличение количества молекул ПКМзета в синапсах конкретных нейронов может улучшить или восстановить память. Такие опыты были проведены, и было показано, что после ослабления памяти оверэкспрессия молекул ПКМзета в одной области мозга приводит к достоверному усилению памяти, контролируемой именно этой областью [13]. То есть если бы была возможность адресно усилить количество молекул этого фермента только в «нужных» для данного вида памяти синапсах, то была бы и возможность интродуцировать ложную память в мозг. На сегодняшний день возможности адресной доставки нет, но ничего не противоречит тому, чтобы такая возможность появилась.

Насколько вечна наша память? Иногда нам кажется, что мы что-то забываем, но на самом деле это не совсем так. Наши воспоминания, к которым мы не обращаемся, просто становятся менее доступными из-за других событий. Мы почти всегда можем их извлечь. По современным представлениям о формировании и возможности изменить долговременную память можно сказать, что чрезвычайно важно учитывать необходимость периода консолидации во время формирования памяти и феномен повторной консолидации при извлечении (активации) памяти.

На самом деле в нервной системе изменение/стирание памяти происходит каждый день, когда определенные нейроны изменяют связи между собой. Но это стирание касается только кратковременной памяти и извлеченных воспоминаний: когда мы активируем воспоминания, то память приходит в лабильное состояние и может изменяться [14], [15]. Так происходит потому, что хранение памяти не зависит от синтеза белка, но активация памяти приводит к кратковременному периоду зависимости от синтеза нового белка. Эта точка зрения появилась в 1998–2000 годах. Ученые выяснили, что память меняется при реактивации. Если мы заблокируем синтез белка в этот момент, то на следующий день извлеченная память не сохранится. Феномен назвали «повторная консолидация», или «реконсолидация памяти». Реконсолидация памяти представляет собой эволюционно консервативное явление, которое описано у большинства позвоночных и многих беспозвоночных животных, что позволяет предположить, что этот феномен отражает основные характеристики образования и хранения памяти [16]. Большое разнообразие строения мозга у различных видов позвоночных и беспозвоночных животных не позволяет считать феномен реконсолидации системным свойством

мозга, а скорее базовым нейронным механизмом, который может быть обнаружен у любых животных с достаточно развитой нервной системой, независимо от конкретной архитектуры мозга.

Ответ на вопрос о том, стирается ли при напоминании и последующей реконсолидации существующая память или блокируется ее использование, [17] дан в очень интересной работе К. Альберини с соавт. [18]. В этой работе экспериментально показано, что в зависимости от времени, прошедшего после выработки у крыс пассивного избегания (*inhibitory avoidance,* в эксперименте измеряется латентность входа в темную камеру после удара в ней током), напоминание может либо укреплять память (до двух недель после обучения), либо угашать память при последовательных тестах (через четыре недели после обучения). По данным этих авторов, загадочным способом исчезает со временем и зависимость реконсолидации от синтеза белка [18].

3. Системные механизмы памяти, или какой размер минимальной нервной сети для формирования памяти

Ставя перед собой цель изучения ассоциативной пластичности, традиционно требующей вовлечения понятия подкрепления, попробуем вначале оценить, может ли это понятие быть применено к максимально редуцированной экспериментальной модели, состоящей всего из нескольких идентифицированных нейронов с известной ролью в поведении. Понятие подкрепления является одним из ключевых при изучении механизмов обучения и памяти, которые в последнее время проводятся не только на поведенческом уровне, но в значительной части на модельных системах: срезах мозга позвоночных, изолированной нервной системе моллюсков, синаптически связанных нейронах ин витро. При этом в подавляющем большинстве случаев используется терминология, разработанная для поведения животных.

В наших экспериментах было проведено модельное исследование подкрепляющего воздействия и формирования ассоциативной памяти на уникальной для животного мира модели их 3 взаимосвязанных нейронов. У виноградной улитки идентифицированы премоторные (командные) интернейроны оборонительного (withdrawal) поведения, которые образуют глутаматергический синапс с идентифицированными первично-сенсорными механорецептивными нейронами. В педальном ганглии идентифицированы уникальные серотонергические нейроны, посылающие отростки именно в тот нейропиль, в котором находятся синаптические контакты этих двух нейронов. В качестве подкрепления использовалась внутриклеточная активация деполяризующим током всего одного модуляторного серотонинергического нейрона, совпадающая или не совпадающая во времени с тестирующей активацией пресинаптического глутаматергического нейрона (рис.1).

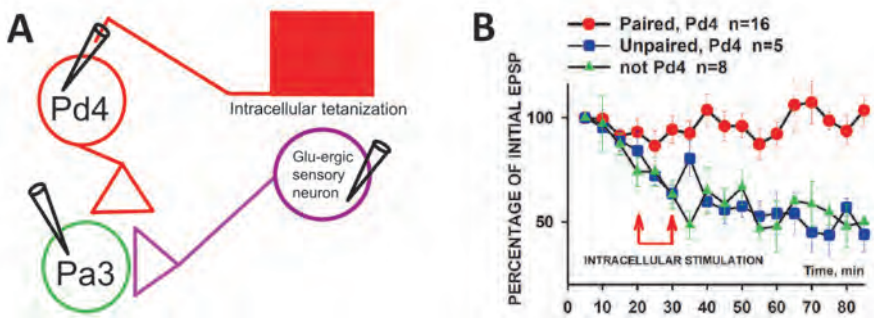

Рисунок 1. Внутриклеточная активация нейрона
Изменения амплитуды моносинаптического ВПСП в премоторном нейроне оборонительного поведения (Pa3) при сочетанной или несочетанной (интервал 3 минуты) активации серотонинергического нейрона (Pd4) с внутриклеточной активацией сенсорного нейрона. Дополнительно показаны данные контрольного эксперимента (зеленые кружки) при подкрепляющей сочетанной стимуляции произвольного нейрона педального ганглия (не Pd4). А – схема связей идентифицированных нейронов в нервной системе моллюска; В – усредненные данные изменения амплитуды ВПСП в нейронах Pa3 при тестировании 1 раз в 5 минут. Стрелками отмечена длительность тренировочной сессии, во время которой стимуляция пресинаптического нейрона (1/2мин) с латентностью 0.5с сочетанно/несочетанно подкреплялась разрядом Pd4 или другого нейрона. Разница в ответах высоко достоверна только при сочетанном подкреплении серотонергическим нейроном. Данные модифицированы из [19], [20].

Полученные нами данные на такой минимальной сети из 3 нейронов [19], [20] показывают, что внутриклеточная активация одного модуляторного серотонергического нейрона, ассоциированная во времени с активацией сенсорного нейрона и ВПСП в постсинаптическом нейроне, является необходимым и достаточным условием для долговременного (часы) изменения эффективности исследуемой синаптической связи. Существенно отметить, что собственно активность подкрепляющей клетки или аппликация серотонина, не ассоциированные во времени с активацией данного синапса (минимальный интервал 3 минуты), не вызывают изменений мембранного потенциала ни в сенсорном нейроне, ни в постсинаптическом для него премоторном нейроне. Существенно отметить, что оптическая регистрация уровня входящего кальция в постсинаптическом нейроне показала, что выделение серотонина модулирующим нейроном, происходящее при подкрепляющей активации, вызывает существенное и длительное увеличение количества внутриклеточного кальция, то есть может служить основой для долговременных изменений синаптической эффективности при условии совпадения во времени с приходящим синаптическим сигналом [19], [20]. Эти изменения в постсинаптическом нейроне являются только началом (индукцией) долговременных изменений, которые с участием ретроградных посредников могут влиять на пресинапс, активировать долговременные изменения в постсинапсе.

Таким образом, можно сказать, что понятие подкрепления может быть использовано на уровне регуляции функционирования одной клетки, а ассоциативные процессы могут быть показаны в системе всего из 3 нейронов.

4. Молекулярная система для повреждения памяти

Из-за чего модифицируется/стирается память? В каждом синапсе, где воспроизводится молекула протеинкиназы М-зета, при входе ионов кальция активируется синтез оксид азота. Показано, что оксид азота синтезируется прямо в синапсах, но существует в свободной форме всего несколько секунд. Оксид азота представляет собой свободный радикал со свободным электроном, который присоединяется ко всему, что рядом, связывается с любыми белками и меняет их конформацию, что приводит к изменению физиологической функции белка.

В последние годы накопилось огромное количество данных о роли нитроксида в работе практически всех органов, включая мозг. Ранее считалось, что фермент NO-синтаза в больших количествах содержится только в некоторых нервных клетках у позвоночных и беспозвоночных животных, но при блокаде синтеза NO или при применении скавенджеров (связывающих свободную молекулу NO) практически во всех случаях показана необходимость присутствия NO для многих процессов, включая формирование, консолидацию памяти и пластичность нейронных систем [21]–[26]. Универсальность участия свободного радикала NO почти во всех процессах жизнедеятельности, кратковременность его действия и очень большой разнобой данных, часто противоречащих друг другу, затрудняют исследование роли NO в обучении и памяти.

Хорошо известно свойство свободного радикала NO вступать в ковалентную связь со многими соединениями, включая ферменты (гуанилатциклаза) или другие белковые и небелковые соединения. Одним из основных способов взаимодействия с белками является S-нитрозилирование, ковалентное связывание NO с тиоловой группой цистеина, которое изменяет физиологическую функцию белка и его третичную конформацию, в большинстве случаев приводя к подавлению его функциональной роли. Второй путь взаимодействия через систему гуанилатциклазы активирует каскады внутриклеточных посредников и запускает увеличенный синтез белков, в том числе именно тех, которые подверглись нитрозилированию. Таким образом, фактически одновременно NO подавляет функцию белков и активирует синтез новых белков. В литературе уже существует представление об NO как о двуликой молекуле, так как эта молекула обладает одновременно цитотоксическим и цитопротекторным действием («a Janus molecule», см. [27]).

Эта двуликость действия NO навела нас на мысль о его роли в процессе реконсолидации памяти, во время которой, как считают многие авторы, происходит стирание/блокировка существующей памяти (разрушение белков) и запуск формирования новой памяти, зависящей от синтеза белков [15], [28], [29]. Была показана возможность реконсолидации памяти в поведенческих экспериментах на виноградной улитке [30], в которых было установлено, что введение блокатора синтеза новых белков обученным избегать определенную обстановку улиткам и напоминание на фоне блокаторов синтеза белков (БСБ) об этой обстановке приводило к полному исчезновению памяти при тестировании через несколько дней. Из этого можно сделать вывод (1) о необходимости синтеза новых белков, то есть о формировании новой

памяти, при напоминании, и о (2) наличии процесса дестабилизации (или лабилизации, или стирания) «старой» памяти при реактивации. Мы предположили, что если NO участвует в феномене исчезновения существовавшей памяти в этих условиях, то блокада синтеза NO может сохранить эту память. В проведенных экспериментах на улитках [31] убедительно продемонстрировано, что блокада производства NO или применение скавенджеров NO препятствует исчезновению долговременной памяти при реактивации на фоне БСБ, что подтверждает гипотезу о роли NO в стирании памяти.

Формирование новой памяти обычно не рассматривается как зависимое от существования или исчезновения «старой» памяти, поэтому этот пласт работ мы анализировать не будем. Однако в ситуации переучивания «старая» память должна быть либо заблокирована, либо стерта. Нам удалось показать, что именно в этой ситуации для исчезновения проявлений старой памяти необходимо участие NO. Учитывая известные данные о периоде консолидации памяти и необходимости синтеза белка, самым простым предположением было бы постулировать локальное измененение функций белковых молекул, которое на поведенческом уровне при реконсолидации на фоне блокады синтеза нового белка проявится в виде исчезновения старой памяти. Если же в тех же условиях дополнительно блокировать производство NO, то наблюдается сохранение существующей памяти [31]. Существенно, что нам удалось повторить эксперименты в той же парадигме и на млекопитающих. Применение блокатора синтеза белка вызывало во время реактивации памяти у крыс на условный стимул (звук) достоверное ослабление памяти, тогда как добавление блокатора синтеза оксида азота снимало этот эффект и память была даже лучше, чем в контроле [32]. Полученные данные о сохранении старой памяти при блокаде производства NO во время процедуры напоминания прямо указывают на необходимость NO для стирания/блокировки старой памяти.

Гипотеза о молекулярном механизме модификации памяти

Попробуем на основании известных данных выстроить последовательность событий в глутаматергическом синапсе, которые приводят к образованию памяти, сделав допущение о том, что образование новой молекулы PKMζ является результатом процесса обучения и показателем формирования новой памяти. Прежде всего, при индукции пластических сдвигов в активированном синапсе активируются рецепторы глутамата (рис. 2), причем хорошо известно, что молекула нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) расположена в постсинапсе в непосредственном контакте с белком постсинаптической плотности (PSD95), который непосредственно связан также и с NMDA рецептором, поэтому nNOS в первую очередь активируется кальцием, входящим через NMDA рецепторы [33], [34]. Образующийся оксид азота в небольших коцентрациях активирует синтез новых белков через гуанилатциклазную систему, а в локально больших концентрациях (при потенциации) нитрозилирует белки непосредственно вокруг себя в постсинапсе.

Безусловно, молекулы PKM могут быть субстратом нитрозилирования и при реактивации памяти, учитывая их локализацию в постсинапсе (рис. 2). Локальное выделение оксида азота в синапсах нейронов сети, участвующей в извлечении памяти, может происходить на таком же уровне, как и при обучении, так как убедительно показано, что нейроны при напоминании активируются с такой же интенсивностью, как и при обучении [35].

Интересно отметить, что процесс реактивации консолидированной памяти сопровождается активным распадом белков, при котором происходит полиубиквитинирование белков с их дальнейшей деградацией в протеасомах [36]. Деградация белков – условие необходимое, так как при ингибировании протеасомального распада белков нарушение памяти при применении БСБ при реактивации памяти отсутствует [37], [38]. Существенно отметить, что распад белков необходим не только для реконсолидации, но и для процесса консолидации долговременной памяти [39].

Недавно показано, что оксид азота участвует также и в запуске протеасомной деградации белка, необходимость которой при долговременных пластических синаптических изменениях также показана [32], [40]. Таким образом, при активации нервной клетки при индукции долговременной пластичности неизбежно образуется оксид азота, локально запускающий процессы разрушения белка именно в данном синапсе.

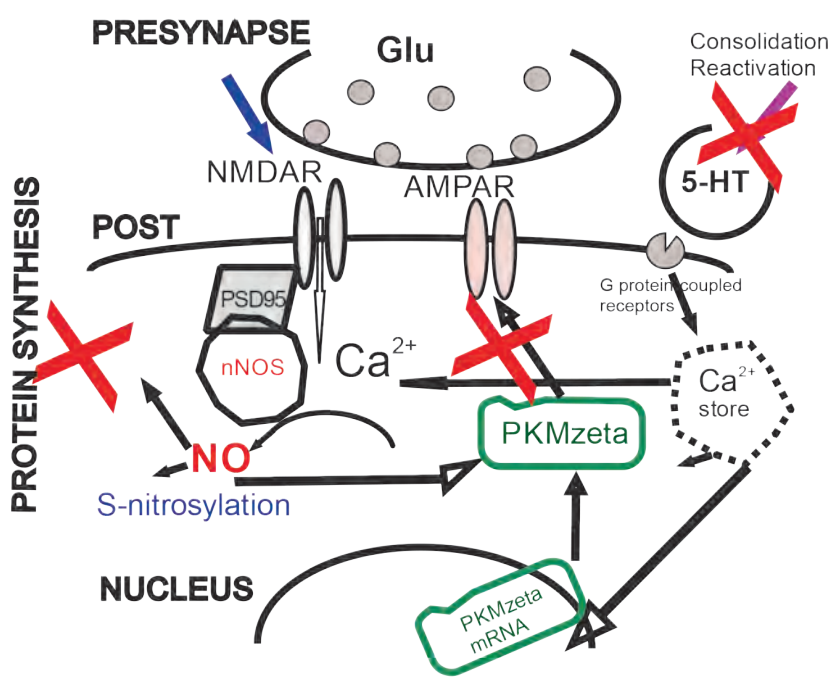

Рисунок 2. Схематическое изображение отношений участников процесса пластических изменений в синапсе. Нейрональная nNOS активируется кальцием, проходящим через NMDA рецепторы максимально быстро, так как nNOS колокализована на белке постсинаптической плотности PSD-95. Таким образом, белок PSD-95 физически связывает nNOS с NMDA рецепторами.

5. Роль глии в формировании, воспроизведении и хранении памяти, или как медленная глия может участвовать в быстрых процессах

Роль глиальных клеток в регуляции высших функций мозга давно обсуждается в научной литературе, и сейчас нет никаких сомнений, что дегенеративные изменения разных видов глии прямо коррелируют с патологиями мозга (обзор см. [42]). Исключительно важна роль глии для пластических процессов в мозге, включая обучение и формирование памяти, причем молекулярные механизмы взаимодействия глии и нейронов неплохо изучены [43]. Выделяемые при активации нейрона ионы и медиаторы захватываются окружающими глиальными клетками (в основном астроцитами), и, в зависимости от степени активации нейронов, локально меняется и биохимическая активность глии, которая с некоторой задержкой выделяет глиотрансмиттеры (глутамат, АТФ, аденозин, D-серин, белки, микроРНК и др.). Глиотрансмиттеры на долгое время (десятки минут) регулируют работу нейронов, модулируя синаптические ответы и, в конечном счете, поведение [42], [44]. К настоящему времени с использованием современных подходов для избирательной активации/торможения глии (оптогенетика, хемогенетика) убедительно показано ее модулирующая роль в формировании памяти, пищевом поведении, регуляции сна и так далее (обзор см. [45]). Показана возможность регуляции долговременной потенциации ответов нейронов гиппокампа при оптогенетической активации глии, причем при использовании ионотропного светочувствительного белка наблюдалась депрессия синаптических ответов, а при использовании метаботропного пути и выделения кальция из внутриклеточных депо наблюдалась потенциация синаптических ответов [46], то есть регуляция функционирования нейронных сетей со стороны глии может быть в обе стороны.

Если учесть, что каждый астроцит, которых больше, чем нейронов, своей сетью тончайших отростков покрывает площадь, на которой находятся около 80 тысяч синапсов [47], то приходится признать, что выделение глиотрансмиттеров, вызванное активностью всего одного нейрона, неизбежно влияет и на синапсы примерно 8-10 соседей активированного нейрона. Это означает, что соседи активированного нейрона, получавшие до этого подпороговую информацию, могут через десятки минут включиться в новую сеть с помощью положительной обратной связи со стороны астроцитов, хотя и с большой задержкой. Длительные наблюдения за сотнями «нейронов места» в гиппокампе с помощью минископа показывают, что часть нейронов перестает участвовать в работе этой сети ([48]), а их соседи начинают выполнять их функцию. Логично предположить, что именно интеграция астроцитами синаптических областей соседних нейронов может быть механизмом подобной сетевой пластичности энграммы памяти и одновременно механизмом поддержания энграммы.

Может ли глия участвовать в процессах формирования памяти, если сочетание 2-3 секунд звука или нахождения в камере, подкрепленное ударом тока длительностью 1-2 секунды, хранится в памяти месяцы и годы? Здесь

крайне существенно отметить, что, несмотря на кратковременность событий, в первые десятки минут после момента обучения на самом деле никакой специализированной памяти пока еще и нет! Очень наглядно это видно на простых животных, брюхоногих моллюсках, которых бьют током, когда они едят определенную пищу. Если их протестировать через сутки, то окажется, что именно эта пища (морковь) вызывает оборонительные реакции, но другая (салат) прекрасно поедается, если улитка голодная [49]. Однако если попробовать сразу после обучения (первый час) дать улитке любой вид пищи, то она ничего есть не будет, на любой раздражитель будет наблюдаться оборонительная реакция. В школе И.П. Павлова подобные эффекты объяснялись генерализацией реакций животного из-за последействия сильного подкрепления, однако не все так просто! Если вернуться к простым нервным системам и проанализировать на уровне нейронов наблюдаемые изменения, то оказывается, что, действительно, период последействия сильного подкрепления есть, и это видно по реакциям нейронов на все стимулы, наблюдается повышенная спонтанная активность. Однако все проявления неспецифической фасилитации заканчиваются в нейронах уже через 40-50 минут, но ответы на условный стимул (реакция на каплю жидкой пищи на кожу у нейронов оборонительного поведения) только появляются через 90-120 минут и продолжают усиливаться. Если эти изменения происходят в синапсах, то почему не видны сразу? Одна из возможных интерпретаций заключается в том, что в момент совпадения условного и безусловного стимула одновременно запускаются два независимых процесса – кратковременные изменения синаптической проводимости, проявляющиеся сразу, и долговременные, которые проявляются с временным сдвигом не менее часа. О существовании этих двух процессов написано много, и большинство авторов сходится во мнении, что кратковременная память обеспечивается синаптическими процессами, тогда как долговременная напрямую зависит от эпигенетической регуляции экспрессии определенных генов [50]. Считается, что эпигенетические регуляторы открывают «окно» для долговременных изменений в экспрессии генов, в том числе их метилирования. А память – это и есть долговременные изменения в экспрессии генов. Временно́е течение формирования памяти, консолидация и реконсолидация регулируются активацией/инактивацией эпигенетических факторов. В литературе много свидетельств эффективной эпигенетической регуляции процессов формирования, хранения и воспроизведения памяти [51], [52]. Но вопрос о том, откуда собственно берутся эпигенетические регуляторы в мозге и почему действуют с такой большой задержкой, остается открытым.

Сравнительно недавно вышла статья [53], в которой экспериментально показана роль глии в эпигенетической регуляции памяти у мышей, причем для этого используются как хорошо известные метаболические пути синтеза холестерола и роль микроРНК [54], так и впервые описанные функции белка АроЕ, известного как маркер болезни Альцгеймера. Существенно отметить, что АроЕ синтезируется в основном в астроцитах (у человека исключительно в глие) и выделяется в межклеточную среду в ответ на длительную активацию нейронов. У этого белка есть собственные экстраклеточные рецепторы [55] с которыми АроЕ связывается, перенося в нейрон липопротеины

и запуская синтез необходимого для работы синапсов холестерола. Однако этим регуляторная функция астроцитов не ограничивается. В работе показано, что в третичной структуре АроЕ присутствуют некие «карманы», в которых через клеточную мембрану переносятся также синтезируемые в глие и выделяемые в межклеточное пространство микроРНК, которые специфически регулируют активность целого ряда генов в нейронах, приводя в итоге к увеличению ацетилирования гистонов. Блокада этого пути эффективно нарушает образование памяти у мышей. Существенным для нашего рассмотрения является то, что при активации нейронов энграммы памяти с некоторой задержкой выделяются в межклеточное пространство регуляторные вещества, синтезируемые в глии, которые еще через какое-то время связываются с рецепторами нейрональной мембраны и переносят в клетку важные для формирования памяти эпигенетические регуляторы. Очевидно, что при недостаточной активации нейронов энграммы этот путь регуляции не сработает и регуляции экспрессии генов не произойдет. При адекватной для формирования памяти активации нейронной сети этот путь срабатывает с задержкой, и открывается «окно возможностей» для регуляции уровней экспрессии генов пластичности, что и может быть важнейшим моментом в работе мозга и основой для долговременных изменений при формировании памяти. Роль глии в этом случае заключается в формировании задержки и «оценки» уровня активации нейронной сети памяти (энграммы), фактически отсекая от долговременных изменений те случаи, когда активация кратковременна или недостаточна.

6. Память и нейрогенетика, или как регуляция экспрессии генов в разных нейронах может быть основой формирования памяти

Принципиальным вопросом остается дилемма: происходящие при обучении изменения синаптической эффективности являются основой долговременной памяти или все же эпигенетически регулируемые изменения экспрессии генов в конкретных нейронах представляют собой основной механизм долговременного хранения важной для организма информации.

Как уже было отмечено в предыдущих разделах, изменения эффективности синапсов являются основой долговременных изменений поведения и наблюдаются как во время формирования памяти, так и после периода консолидации. Больше того, описаны механизмы возможного локального сохранения изменений в отдельных синапсах неограниченное время (ПКМзета). Тем не менее на протяжении многих лет ученые высказывают мнение, что хранение информации не может быть не связано с нуклеиновыми кислотами, а учитывая неизменность генома, единственная возможность долговременных локальных изменений в нервной сети связана с эпигенетической регуляцией эффективности экспрессии генов именно в нейронах энграммы [51].

Подтверждением этой точки зрения являются исследования изменений плотности синапсов нейронов поля CA1 гиппокампа крыс непосредственно после пространственного обучения и в контроле [56], которые убедительно

показали, что достоверных различий между обученными и необученными животными в среднем не наблюдается. Это выглядит логичным, так как мозг должен быть готовым к последующим пластическим изменениям, но не отрицает существенных изменений в конкретных нейронах энграммы пространственной памяти, которые составляют в этой области гиппокампа около 1%, и изменения в них не могут повлиять на суммарную оценку.

Абсолютно не отрицая необходимость изменений синаптической эффективности при формировании памяти, все же необходимо учитывать, что любые долговременные изменения в синапсах требуют изменений в экспрессии генов, иначе все процессы через часы-дни вернутся в исходное состояние, так как не будет произведено необходимое дополнительное количество молекул белков или мРНК, которое поддержит произошедшие изменения. Иными словами, если центральный аппарат в ядре одного нейрона в результате обучения изменил свою работу, это неизбежно найдет свое отражение в работе каждого из 10 тысяч синапсов, причем в зависимости от предыстории каждой синаптической области.

Таким образом, формирование нейронной сети (энграммы), активирующейся впоследствии при воспоминании о каком-то конкретном событии, можно представить следующим образом:

а) в результате совпадения во времени активации сенсорных входов и активации постсинаптических нейронов моноаминами (подкрепление) в постсинаптических структурах индуцируется увеличение количества фермента ПКМзета, приводящее через активацию транспорта AMPA рецепторов к избирательному увеличению эффективности затронутых синапсов;

б) астроциты вокруг активированных при обучении нейронов реагируют с определенной задержкой выбросом в межклеточное пространство комплекса глиотрансмиттеров, включающих микроРНК, проникающих с помощью ApoE через мембрану нейронов энграммы и через ацетилирование гистонов открывающих возможность регуляции экспрессии генов пластичности;

в) в нейронах энграммы в период консолидации (4-6 часов после обучения) есть возможность изменить экспрессию определенных генов и произвести больше (или меньше) определенных белков, необходимых для усиления (уменьшения) работы синапсов и синхронизированной активации нейронов энграммы данной памяти;

г) при напоминании о данном виде памяти все повторяется, и есть возможность модифицировать нейронную сеть, особенно учитывая тот факт, что активированные астроциты влияют на соседей активированных нейронов, вовлекая их в работу энграммы.

Список литературы

1. *D.L. Glanzman,* «Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates.,» Curr. Biol., vol. 20, no. 1, pp. R31-6, Jan. 2010.

2. *LL. Moroz, M.A. Nikitin, P.G. Poličar, A.B. Kohn, and D.Y. Romanova,* «Evolution of glutamatergic signaling and synapses,» Neuropharmacology, vol. 199, Nov. 2021.

3. *L.L. Moroz,* «Multiple Origins of Neurons From Secretory Cells.,» Front. cell Dev. Biol., vol. 9, p. 669087, Jul. 2021.

4. *A. Di Cosmo, V. Maselli, and G. Polese,* «Octopus vulgaris: An Alternative in Evolution,» Results Probl. Cell Differ., vol. 65, pp. 585–598, 2018.

5. *J. Lisman,* «Criteria for identifying the molecular basis of the engram (CaMKII, PKMzeta),» Mol. Brain, vol. 10, no. 1, Nov. 2017.

6. *T.C. Sacktor,* «Memory maintenance by PKMzeta --- an evolutionary perspective,» Mol. Brain, vol. 5, no. 1, p. 31, 2012.

7. *T.C. Sacktor,* «Memory maintenance by PKMzeta--an evolutionary perspective,» Mol Brain, vol. 5, p. 31, 2012.

8. *S.L. Fulton et al.,* «Lifelong reductions of PKMζ in ventral hippocampus of nonhuman primates exposed to early-life adversity due to unpredictable maternal care,» vol. 28, no. 9, pp. 341–347, Sep. 2021.

9. *C. Hsieh et al.,* «Persistent increases of PKMζ in memory-activated neurons trace LTP maintenance during spatial long-term memory storage,» Eur. J. Neurosci., vol. 54, no. 8, pp. 6795–6814, Oct. 2021.

10. *E. Chesnokova et al.*, «Experiments with snails add to our knowledge about the role of apkc subfamily kinases in learning,» Int. J. Mol. Sci., vol. 20, no. 9, May 2019.

11. *S.R.M. Schuette, D. Fernandez-Fernandez, T. Lamla, H. Rosenbrock, and S. Hobson,* «Overexpression of Protein Kinase M in the Hippocampus Enhances Long-Term Potentiation and Long-Term Contextual But Not Cued Fear Memory in Rats,» J. Neurosci., vol. 36, no. 15, pp. 4313–4324, 2016.

12. P.M. Balaban et al., «Homolog of protein kinase Mzeta maintains context aversive memory and underlying long-term facilitation in terrestrial snail Helix,» Front Cell Neurosci, vol. 9, no. June, p. 222, 2015.

13. *R. Shema et al.,* «Enhancement of Consolidated Long-Term Memory by Overexpression of Protein Kinase M in the Neocortex,» Science (80-.)., vol. 331, no. 6021, pp. 1207–1210, Mar. 2011.

14. *O.O. Litvin and K. V. Anokhin,* «Mechanisms of memory reorganization during retrieval of acquired behavioral experience in chicks: the effects of protein synthesis inhibition in the brain,» Neurosci. Behav. Physiol., vol. 30, no. 6, pp. 671–678, 2000.

15. *K. Nader, G.E. Schafe, and J.E. Le Doux,* «Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.,» Nature, vol. 406, no. 6797, pp. 722–726, 2000.

16. *T.K. Gaĭnutdinova, R.R. Tagirova, A.I. Ismailova, L.N. Muranova, K.L. Gaĭnutdinov, and P.M. Balaban,* «Protein synthesis-dependent reactivation of environmental conditioned reflex in terrestrial snails | Zavisimaia ot belkovogo sinteza reaktivatsiia obstanovochnogo uslovnogo refleksa u vinogradnoi ulitki.,» Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I P Pavlova, vol. 54, no. 6, 2004.

17. *K.V. Anokhin, A.A. Tiunova, and S.P.R. Rose,* «Reminder effects - Reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks,» Eur. J. Neurosci., vol. 15, no. 11, pp. 1759–1765, 2002.

18. *M.C. Inda, E.V. Muravieva, and C.M. Alberini,* «Memory retrieval and the passage of time: From reconsolidation and strengthening to extinction,» J. Neurosci., vol. 31, no. 5, pp. 1635–1643, Feb. 2011.

19. *P.M. Balaban, N.I. Bravarenko, O.A. Maksimova, E.Nikitin, V.N. Ierusalimsky, and I. S. Zakharov,* «A Single Serotonergic Modulatory Cell Can Mediate Reinforcement in the Withdrawal Network of the Terrestrial Snail,» Neurobiol. Learn. Mem., vol. 75, no. 1, pp. 30–50, Jan. 2001.

20. *P.M. Balaban, T.A. Korshunova, and N.I. Bravarenko,* «Postsynaptic calcium contributes to reinforcement in a three-neuron network exhibiting associative plasticity,» Eur. J. Neurosci., vol. 19, no. 2, pp. 227–233, Jan. 2004.

21. *J.W. Jacklet,* «Nitric oxide signaling in invertebrates.,» Invert. Neurosci., vol. 3, no. 1, pp. 1–14, Jun. 1997.

22. *U. Müller,* «The nitric oxide system in insects,» Prog Neurobiol, vol. 51, no. 3, pp. 363–381, 1997.

23. *Fedele E, Raiteri M., E. Fedele, M. Raiteri, Fedele E, and Raiteri M.,* «In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway,» Prog. Neurobiol., vol. 58, no. 1, pp. 89–120, 1999.

24. *R.D. Hawkins, H. Son, and O. Arancio,* «Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus.,» Prog. Brain Res., vol. 118, pp. 155–72, 1998.

25. *S.P. Rose,* «God's organism? The chick as a model system for memory studies.,» Learn. Mem., vol. 7, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2000.

26. *H.G. Wang et al.,* «Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins,» Neuron, vol. 45, no. 3, pp. 389–403, 2005.

27. *V. Calabrese, C. Cornelius, E. Rizzarelli, J.B. Owen, A.T. Dinkova-Kostova, and D.A. Butterfield,* «Nitric oxide in cell survival: a janus molecule.,» Antioxid. Redox Signal., vol. 11, no. 11, pp. 2717–39, Nov. 2009.

28. *K.V Anokhin, A.A. Tiunova, and S.P.R. Rose,* «Reminder effects - reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks.,» Eur. J. Neurosci., vol. 15, no. 11, pp. 1759–65, Jun. 2002.

29. *S. Duvarci, K. Nader, and J.E. LeDoux,* «De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala.,» Learn. Mem., vol. 15, no. 10, pp. 747–55, Oct. 2008.

30. *T.H.H. Gainutdinova et al.,* «Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis,» Learn Mem, vol. 12, no. 6, pp. 620–625, 2005.

31. *P.M. Balaban et al.,* «Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails, Eur. J. Neurosci., vol. 40, no. 6, 2014.

32. *N. Bal, M. Roshchin, S. Salozhin, and P. Balaban,* «Nitric Oxide Upregulates Proteasomal Protein Degradation in Neurons,» Cell. Mol. Neurobiol., vol. 37, no. 5, pp. 1–7, 2016.

33. *K.S. Christopherson, B.J. Hillier, W.A. Lim, and D.S. Bredt,* «PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain.,» J. Biol. Chem., vol. 274, no. 39, pp. 27467–73, Sep. 1999.

34. *D.S. Bredt,* «Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem.,» J. Cell Sci., vol. 116, no. Pt 1, pp. 9–15, Jan. 2003.

35. *H. Gelbard-Sagiv, R. Mukamel, M. Harel, R. Malach, and I. Fried,* «Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall.,» Science (80-.)., vol. 322, no. 5898, pp. 96–101, 2008.

36. *A.N. Hegde, K.A. Haynes, S.V. Bach, and B.C. Beckelman,* «Local ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis and long-term synaptic plasticity,» Front. Mol. Neurosci., vol. 7, Dec. 2014.

37. *S.H. Lee et al.,* «A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia,» Proc Natl Acad Sci USA, vol. 109, no. 35, pp. 14200–14205, 2012.

38. *S.-Q. Ren et al.,* «PKCλ is critical in AMPA receptor phosphorylation and synaptic incorporation during LTP,» EMBO J., vol. 32, no. 10, pp. 1365–1380, Mar. 2013.

39. *J. Artinian, A.-M. T. McGauran, X. De Jaeger, L. Mouledous, B. Frances, and P. Roullet,* «Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only

long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation,» Eur. J. Neurosci., vol. 27, no. 11, pp. 3009–3019, Jun. 2008.

40. *Н.В. Баль and П.М. Балабан,* «Убиквитинзависимый распад белков необходим для долговременной пластичности и памяти,» Нейрохимия, vol. 32, no. 4, pp. 275–284, 2015. NV Bal, PM Balaban. Ubiquitin-dependent protein degradation is necessary for long-term plasticity and memory. Neurochemical Journal 9 (4), 237–244.

41. *A.O. Koob,* «Astrocytes Imagined,» J. Integr. Neurosci., vol. 21, no. 4, Jul. 2022.

42. *A. Araque, G. Carmignoto, P.G. Haydon, S.H.R. Oliet, R. Robitaille, and A. Volterra,* «Gliotransmitters travel in time and space,» Neuron, vol. 81, no. 4, pp. 728–739, Feb. 2014.

43. *K.A. Lyon and N.J. Allen,* «From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior,» Front. Neural Circuits, vol. 15, Jan. 2022.

44. *A. Maltsev et al.,* «Bidirectional regulation by 'star forces': Ionotropic astrocyte's optical stimulation suppresses synaptic plasticity, metabotropic one strikes back.,» Hippocampus, Dec. 2022.

45. *C. Agulhon et al.,* «What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?,» Neuron, vol. 59, no. 6, pp. 932–46, Sep. 2008.

46. *Y. Ziv et al.,* «Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes,» Nat. Neurosci., vol. 16, no. 3, pp. 264–266, Mar. 2013.

47. *P.M. Balaban,* «Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail,» Neurosci. Biobehav. Rev., vol. 26, no. 5, pp. 597–630, 2002.

48. *A.R. Gold and D.L. Glanzman,* «The central importance of nuclear mechanisms in the storage of memory,» Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 564, pp. 103–113, Jul. 2021.

49. *A. Bédécarrats, S. Chen, K. Pearce, D. Cai, and D. L. Glanzman,* «RNA from Trained Aplysia Can Induce an Epigenetic Engram for Long-Term Sensitization in Untrained Aplysia,» eneuro, vol. 5, no. 3, p. ENEURO.0038-18.2018, 2018.

50. *A.B. Zuzina and P.M. Balaban,* «Contribution of histone acetylation to the serotonin-mediated long-term synaptic plasticity in terrestrial snails.,» J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol., vol. 208, no. 5–6, pp. 521–535, Nov. 2022.

51. *X. Li et al.,* «Astrocytic ApoE reprograms neuronal cholesterol metabolism and histone-acetylation-mediated memory,» Neuron, vol. 109, no. 6, pp. 957-970.e8, Mar. 2021.

52. *H. Karahan, L.C. Dabin, M.D. Tate, and J. Kim,* «MicroRNAs on the move: microRNAs in astrocyte-derived ApoE particles regulate neuronal function,» Neuron, vol. 109, no. 6, pp. 907–909, Mar. 2021.

53. *D.M. Holtzman, J. Herz, and G. Bu,* «Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease,» Cold Spring Harb. Perspect. Med., vol. 2, no. 3, 2012.

54. *S.D. Vann et al.,* «Lack of change in CA1 dendritic spine density or clustering in rats following training on a radial-arm maze task,» Wellcome open Res., vol. 5, 2020.

Глава 8. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

М.А. Островский

Путь от физиологии как науки фундаментальной к медицине был и остается проблемой актуальнейшей. Это понимал еще С.П. Боткин, организовав в своей клинике физиологическую лабораторию и пригласив руководить ею молодого И.П. Павлова. Именно пути от физиологии к медицине совершенно конкретно обсуждались на знаменитых Павловских «Клинических средах». Сейчас, спустя столетие, проблема успешного и эффективного прохождения этого пути, получившего название «трансляционная медицина», вышла на первый план.

Настоящая глава посвящена клинической физиологии зрительной системы. Мы рассмотрим два ключевых процесса – процесс фоторецепции (первичный процесс зрения), совершающийся в зрительных клетках сетчатки глаза и процесс передачи зрительной информации в зрительные центры мозга.

В случае процесса фоторецепции речь идет о понимании его молекулярного механизма в норме и его нарушениях, приводящих к патологии. Только такие знания позволяют осознанно подойти к разработке новых методов диагностики, притом желательно как можно ранней, доклинической диагностики, и к поиску новых путей лечения – фармакологического, генно-терапевтического или иного типа лечения. Понимание природы патологического процесса позволяет наметить также стратегии профилактики и\или замедления развития заболевания, того или иного, сетчатки. Предмет такого рода рассмотрения и можно обозначить, как нам представляется, как «клиническую физиологию фоторецепции или первичного процесса зрения». Конечными этапами такого пути от фундаментальных знаний о механизмах фоторецепции к клинике является разрешение на клинические испытания и, в случае успеха, реальное применение новых методов диагностики и лечения в офтальмологической практике.

СЕТЧАТКА

Первичный процесс зрения (фоторецепция)

Под первичным процессом зрения (зрительной фоторецепцией) мы понимаем процесс, который запускается в зрительных клетках сетчатки глаза поглощением квантов света молекулами зрительного пигмента родопсина и завершается возникновением в них возникновением зрительного сигнала (фоторецепторного потенциала).

Молекулярный механизм фоторецепции, в котором принимают участие множество белков, в настоящее время достаточно хорошо изучен. Ключевую роль в нем играет зрительный пигмент – светочувствительный белок

родопсин в палочках, отвечающих за сумеречное зрение, и несколько отличающиеся от палочкового родопсина зрительные пигменты в колбочках, отвечающие за дневное, цветовое зрение. В первой части этой главы основное внимание уделено молекулярной физиологии и молекулярной патологии родопсина. Следует подчеркнуть, что во всех, самых разнообразных органах зрения, во всех типах фоторецепторных клеток, начиная от светочувствительных клеток простейших многоклеточных организмов и до зрительных клеток высокоорганизованных беспозвоночных (рабдомы) и позвоночных (палочки и колбочки) животных и человека, светочувствительная молекула принципиально одна и та же – это зрительный пигмент (белок) родопсин. Это один из самых древних белков животного царства.

На примере родопсина мы попытаемся в этой главе рассмотреть путь от фундаментальной к клинической физиологии. Иными словами, проследить путь от фундаментальной науки о молекулярных механизмах зрения к офтальмологии, к новым методам диагностики, перспективам лечения и подходам к профилактике заболеваний сетчатки глаза.

Механизм фоторецепции

Молекулярный механизм фоторецепции – возникновения в зрительной клетке фоторецепторного сигнала в ответ на поглощение света зрительным пигментом – выглядит, в самом наикратчайшем изложении, следующим образом. Квант света поглощается хромофорной группой молекулы родопсина – 11-цис ретиналем и изомеризует его. Фотоизомеризация 11-цис ретиналя вызывает серию конформационных перестроек в белковой части молекулы – опсине. Эти перестройки переводят родопсин в физиологически активное состояние. Активированный родопсин запускает ферментативный каскад усиления светового сигнала. Первым этапом каскада является взаимодействие родопсина с G-белком (в фоторецепции он называется трансдуцином), в результате чего трансдуцин активируется. Активированный трансдуцин, а именно его альфа-субъединица, в свою очередь взаимодействует и активирует фермент фосфодиэстеразу. Этот фермент с высокой скоростью гидролизует («разрушает») маленькую молекулу – циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Падение в цитоплазме зрительной клетки концентрации цГМФ приводит к блокированию ионных каналов в ее плазматической мембране. Блокирование каналов приводит к возникновению на этой мембране гиперполяризационного потенциала. Этот потенциал, или фоторецепторный потенциал, и является тем фоторецепторным сигналом, который возник в зрительной клетке в ответ на поглощение кванта света. Распространяясь до пресинаптического окончания, гиперполяризационный фоторецепторный потенциал вызывает замедление или на ярком свету даже прекращение выделения в синаптическую щель нейромедиатора (глутамата). Таким «странным» способом – не ускорением, а замедлением высвобождения нейромедиатора из пресинаптического окончания передается информация в первом фоторецепторном синапсе сетчатки позвоночных животных и человека от зрительной клетки к следующим нервным клеткам – биполярным и горизонтальным.

«Выключение» ферментативного каскада усиления светового сигнала – процесс не менее, если не более, сложный. В нем также принимают участие целый ряд белков. Первым этапом «выключения» каскада является надежная дезактивация родопсина. На этом этапе две стадии. Сначала фермент родопсиновая киназа фосфорилирует молекулу родопсина. Фосфорилирование родопсина приводит к его инактивации, но не полной. Затем фосфорилированный родопсин связывается с другим белком – арестином. Арестин полностью и надежно «выключает» родопсин. В результате после всего этого дезактивированный родопсин уже неспособен связываться с трансдуцином и «запускать» ферментативный каскад усиления. Последующие этапы в сложном механизме «выключения» ферментативного каскада не менее сложны. Подробнее см. [1, 2]. Важно подчеркнуть, что нарушения как механизма «включения», так и, особенно, «выключения» каскада, дефекты ряда белков, участвующих в активации и торможении работы каскада, прямо связаны с патогенезом многих известных дегенеративных заболеваний сетчатки.

Следует отметить, что белок арестин, полностью и надежно «выключающий» в механизме фототрансдукуции активированный родопсин, оказался также сильным антигеном (ему было дано название ***S-антиген***). При нарушении гемато-офтальмического барьера он попадает в кровь и вызывает сильную иммунную реакцию. Принимая это во внимание, нами в начале 80-х годов совместно с Институтом глазных болезней им. Гельмгольца была разработана иммунодиагностика увеитов и ряда других патологий сетчатки. Анализируя соотношение содержания *S-антиген*а и клинических проявлений увеита, мы показали, что *S-антиген* обнаруживаются в слезной жидкости больного глаза гораздо чаще и в значительно более высоких титрах [3-5]. Повышенное содержание *S-антиген*а в слезной жидкости стало свидетельством активности аутоаллергического процесса не только при увеитах, но и при ряде других патологий сетчатки [6,7].

В молекулярной физиологии зрения зрительные пигменты выполняют несколько важнейших функций. Помимо запуска собственно зрительного акта – процесса фототрансдукции, они ответственны за спектральную настройку зрительных клеток (колбочек), обеспечивая возможность цветовосприятия. Принципиально важной функцией родопсина является поддержание низкого темнового теплового шума зрительной клетки (палочки).

Родопсин – типичный представитель обширного семейства G-белок-связывающих рецепторов, играющих ключевую роль в передаче внутри- и межклеточных сигналов в гормональной, нервной и сенсорной (зрение, вкус, обоняние) системах. В темноадаптированной палочке его неактивность, его полное «молчание» как G-белок-связывающего рецептора является необходимым условием ее физиологической способности детектировать один поглощенный квант света. В противном случае на фоне темнового шума детектирование одного кванта было бы невозможно. «Молчание» родопсина в его темновом, необесцвеченном состоянии обеспечивает его хромофорная группа – 11-*цис* ретиналь. Он выступает в качестве эффективного обратного агониста (*inverse agonist*) в молекуле родопсина. Только после поглощения кванта света, как уже было сказано, родопсин как G-белок-связывающий

рецептор переходит в физиологически активное состояние. В активированном состоянии полностью-*транс*-ретиналь, образовавшийся в результате фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя, выступает в молекуле родопсина как мощный лиганд-агонист.

Если в молекулярной физиологии зрения родопсину принадлежит ключевая роль, то и молекулярная патология зрения, патогенез многих дегенеративных заболеваний сетчатки связаны с различными дефектами как самого родопсина (описано более ста его патогенетических мутаций), так и с нарушениями т. н. «зрительного», или «родопсинового цикла».

Остановимся подробнее на «родопсиновом цикле» – его физиологии, патологии и, как следствие, на понимании путей к диагностике, лечению и профилактике заболеваний сетчатки.

Зрительный, или родопсиновый цикл: норма

Название «родопсин» происходит от двух греческих слов: «rhodo» – розовый и «opsis» – видеть. Эксперимент Ференца Болля в 1876 г., послуживший ему основанием для открытия Sehestoff – «зрительного вещества», состоял в том, что вытащенная на свет розовая, темноадаптированная сетчатка лягушки обесцвечивалась, становилась белесой. Болль, по существу, наблюдал фотолиз родопсина в зрительных клетках сетчатки. С тех пор и по сегодняшний день исследования превращений родопсина под действием света остаются «горячей точкой» фотохимии и молекулярной физиологии зрения (подробнее см. [8]).

В последовательности фотопревращения молекулы родопсина можно выделить три физиологически важных стадии (рис. 1). Первая – это сверхбыстрая фотохимическая реакция изомеризации 11-*цис* ретиналя (фемто- и пикосекундная шкала времен). По последним данным, переход ретиналя из *цис*- в *транс*конфигурацию совершается за фантастически короткое время – в пределах 50-70 фемтосекунд (1 фемтосекунда равна 10^{-15} секунды) и с чрезвычайно высокой эффективностью (ее квантовый выход 0.67). Столь уникально быструю и эффективную фотоизомеризацию обеспечивает ближайшее белковое окружение ретиналя в хромофорном центре опсина. Это самая быстрая реакции в фотохимии, известная на сегодняшний день. Подробнее см. [9].

Рисунок 1. Схема фотолиза родопсина

В темноте 11-цис ретиналь ковалентно связан с апобелком опсином (темновое состояние родопсина). При поглощении кванта света 11-цис ретиналь изомеризуется и переходит в полностью-трансконфигурацию. Примерно к 200-й фемтосекунде образуется первый продукт фотолиза – фоторoдопсин. Затем последовательно происходят конформационные перестройки белковой части молекулы – опсина, вследстве чего образуются промежуточные продукты фотолиза, каждый из которых характеризуется своим максимумом спектра поглощения. На схеме указаны длина волны этих максимумов (λmax) и время образования каждого из промежуточных продуктов. Активированный и обесцвеченный родопсин ((λmax = 380 нм) – это промежуточный продукт метародопсин II, который способен связывать и активировать белок трансдуцин (G-белок), запуская тем самым процесс фототрансдукции. Гидролиз ковалентной связи полностью транс-ретиналя с апобелком опсином приводит к высвобождению свободного полностью транс-ретиналя.

Зрительный пигмент родопсин в этом отношении становится парадигмой не только для фотобиологии, но и для фотохимии в целом. Вторая внутримолекулярная стадия – это последовательные конформационные перестройки в белковой части молекулы (опсине), совершающиеся за микро- и миллисекундные времена. Результатом этих перестроек является образование т. н. ***метародопсина II***, который и представляет собой активированный родопсин, способный взаимодействовать с трансдуцином и запускать ферментативный каскад усиления светового сигнала. И, наконец, третья, достаточно медленная стадия – это «развал» молекулы родопсина, т. е. разрыв (гидролиз) ковалентной связи Шиффова основания ретиналя (теперь уже в полностью *транс*изомерной форме) с опсином и его высвобождение в свободном состоянии в фоторецепторную мембрану. Иными словами, молекула родопсина – это молекула однократного действия. Поскольку конечным этапом превращения молекулы родопсина при действии света является ее «развал», разрушение, то процесс фотопревращения родопсина называется фотолизом.

Следует подчеркнуть, что в отличие от других ретиналь-содержащих белков как микробиального, так и животного происхождения, включая зрительные пигменты беспозвоночных, зрительные пигменты позвоночных теряют ретиналь после его фотоизомеризации и инициации процесса фототрансдукции. Одно из возможных объяснений этому исключению из правил – борьба с «шумом». Опсин, лишенный ретиналя, заведомо несветочувствителен.

Естественно, темновое состояние обесцвеченного родопсина в ходе темновой адаптации зрительной клетки, то есть в темноте, должно быть восстановлено. Этот процесс называется регенерацией родопсина. Суть его в том, что 11-*цис* ретиналь должен быть доставлен в фоторецепторную мембрану к опсину, «вставлен» в его хромофорный центр и образовать прочную ковалентную связь с эпсилон-аминогруппой 296-го лизина белковой (опсиновой) части молекулы. Только после этого восстановятся и спектр поглощения родопсина в палочках с максимумом 500 нм, и его светочувствительность. Этот процесс темновой регенерации касается и зрительных пигментов колбочек. Однако, как недавно выяснилось, в колбочках, ответственных за дневное зрение, возможна не только темновая, но и фоторегенерация зрительных пигментов (подробнее см. ниже).

Регенерация зрительных пигментов – ключевой процесс в механизме темновой адаптации сетчатки. За процесс регенерации родопсина в темноте отвечает классический зрительный или родопсиновый цикл. Его подробное исследование началось еще в начале девятнадцатого века. В настоящее время этот цикл изучен во всех деталях. Подробно см. [8, 10-12].

Родопсиновый цикл – это несомненная инновация в ходе эволюции молекулярной физиологии зрения у позвоночных. Однако этот эволюционно «новый» механизм оказался довольно «хрупким», уязвимым, подверженным различного рода нарушениям. «Поломки» этого механизма приводят ко многим патологическим следствиям. С ними связаны патогенез ряда дегенеративных заболеваний сетчатки, повреждающее действие света на сетчатку и ретинальный пигментный эпителий (РПЭ). В частности, нарушение механизма быстрого «убирания» высвободившегося в результате фотолиза родопсина свободного полностью-*транс*-ретиналя приводит как накоплению его самого, так и образованию его производных (бис-ретиналей). И свободный ретиналь, и его производные токсичны и фототоксичны. Будучи, в конечном счете, локализованы, преимущественно в клетках РПЭ, а именно в его липофусциновых гранулах («пигменте старости»), они представляют существенную опасность (подробнее об этом см. ниже).

Зрительный или родопсиновый цикл – многоступенчатый процесс (рис. 2). В нём принимают участие две клеточные структуры: наружные сегменты фоторецепторных клеток – палочек и колбочек и тесно связанные с ними клетки РПЭ. Ключевой, принципиально важной реакцией в этом цикле является обратная изомеризация полностью-*транс*-ретиналя в его 11-*цис* изомерную форму. В силу стерических факторов *транс* → *цис* изомеризация в темноте требует потребления энергии. Открытие фермента, катализирующего эту реакцию, стало в свое время событием. Процесс темновой изомеризации ретиналей представляет большой интерес для химии стереоспецифически изомеризующих ферментов.

Рисунок 2. Схема родопсинового цикла

Изомеризовавший при поглощении кванта света 11-*цис* ретиналь переходит в полностью-*транс* форму. Высвободившийся из хромофорного центра опсина, свободный полностью-*транс*-ретиналь в норме восстанавливается до полностью-*транс*-ретинола. При патологии две молекулы полностью-*транс*-ретиналя взаимодействует с фосфолипидом – фосфатидилэтаноламином, в результате чего, в конечном счете, образуются побочные продукты – бисретиноиды. В норме полностью-*транс*-ретинол реизомеризуется обратно в 11-*цис* ретинол, который затем переходит в 11-*цис* ретиналь. В результате встраивания 11-*цис* ретиналя в хромофорный центр опсина вновь образуется ковалентная связь с апобелком опсином, восстанавливается исходный спектр поглощения родопсина, и он переходит в темновое (регенерированное) состояние, способное вновь при поглощении кванта света запускать процесс фототрансдукции.

Начальная стадия цикла – это удаление из фоторецепторной мембраны свободного полностью-*транс*-ретиналя, высвободившегося из хромофорного центра опсина. Удаление обеспечивают два фермента – полностью-*транс*-ретинолдегидрогеназа 8 (RDH8) и АТФ-зависимый переносчик – мембранный белок ABCR4 (ATP-binding cassette transporter, retina-specific).

Фермент RDH8 в реакции, катализируемой NADPH, восстанавливает токсичный и фототоксичный полностью-*транс*-ретиналь до его нетоксичной спиртовой формы – полностью-*транс*-ретинола. Дефект RDH8 приводит к накоплению в наружном сегменте свободного полностью-*транс*-ретиналя. Особенно сильное накопление происходит в результате обесцвечивания большого количества родопсина при действии на сетчатку слишком яркого света.

Функция АТФ-зависимого кассетного переносчика ABCR4 состоит в переносе полностью-*транс*-ретиналя через фоторецепторную мембрану в цитоплазму. ABCR4 локализован в основном по краям фоторецепторного диска, в его «петлях». Причем ABCR4 переносит через мембрану не столько сам высвободившийся из опсина полностью-*транс*-ретиналь, сколько продукт его взаимодействия с фосфатидилэтаноламином (N-ретинилиден-ФЭА) – одним из трех основных фосфолипидов фоторецепторной мембраны. Дефект ABCR4 также приводит к накоплению в наружном сегменте полностью-*транс*-ретиналя и к массивному накоплению в клетках РПЭ липофусциновых гранул (ЛГ) (подробнее см. ниже).

Целая система ретинол- и ретинальпереносящих белков обеспечивает перенос полностью-*транс*-ретиналя и ретинола из наружного сегмента в клетку РПЭ, и затем перенос обратно синтезированного в РПЭ 11-*цис* ретиналя в наружный сегмент и его доставку в хромофоный центр опсина. Дефекты этих белков также способны приводить к патологическим последствиям. Одним из таких белков-переносчиков является внутриклеточный ретиноид-переносящий белок (interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP). Эффективно связывая как полностью-*транс*-ретинол, так и полностью-*транс*-ретиналь, он играет важную роль не только в переносе, но в защите клетки от их цито- и фототоксического действия. Вместе с тем, как мы в свое время показали, ретиналь, связанный с внутриклеточным ретиноидпереносящим белком, выступает и как фотосенсибилизатор его повреждения, что может рассматриваться как один из механизмов фотоповреждения сетчатки [13,14].

Как уже было сказано выше, ключевой реакцией цикла является темновая изомеризация полностью-*транс*-ретиналя обратно в его 11-*цис*- изомерную форму. Она происходит в клетке РПЭ, куда из наружного сегмента доставляется полностью-*транс*-ретинол. Ферментом, обеспечивающим эту реакцию, является ретиноид-изомерогидролаза (RPE65), изомеризующий полностью-*транс*-ретинол в его 11-*цис*-форму. С помощью другого фермента – 11-*цис*-ретинолдегидрогеназы (11-cis RDH) – 11-*цис*-ретинол окисляется затем в 11-*цис*-ретиналь. После этого 11-*цис*-ретиналь с помощью ретиналь-переносящих белков транспортируется в наружный сегмент, доставляется к белковой части родопсина – опсину и встраивается в его хромофорный центр. Таким образом, родопсиновый цикл замыкается. Регенерированный родопсин восстанавливает свой максимум спектра поглощения в области 500 нм, и он вновь готов, поглотив кванта света, запустить процесс фототрансдукции.

Долгое время оставалось непонятным, каким образом происходит регенерация зрительного пигмента в колбочках – фоторецепторах дневного зрения, нормально функционирующих при постоянном ярком свете. Вопрос можно было сформулировать так: «Только ли классический, темновой родопсиновый цикл с участием фермента RPE65 обеспечивает в колбочках обратную изомеризацию полностью-*транс*-ретиналя в 11-*цис*-ретиналь?» Сравнительно недавно выяснилось, что для колбочек возможен второй путь регенерации (реизомеризации) – световой. Ключевую роль в фотоизомеризации ретиналя в колбочках, как оказалось, играет другой ретинальсодержащий белок – т. н. «ретинальный G-белок-связывающий рецептор (retinal G-protein-coupled receptor (RGR) [15]. Энергии кванта видимого света RGR белку для осуществления *транс*-*цис*-перехода оказывается вполне достаточно. Ген RGR белка экспрессируется в глиальных Мюллеровских клетках, тесно прилегающих к колбочкам. Комплекс 11-*цис*-ретиналя с RGR белком, образовавшийся при действии света кране нестабилен, он легко подвержен распаду (гидролизу), особенно в присутствии акцептора 11-*цис*-ретиналя – ретинальпереносящего белка. Этот переносящий белок и доставляет 11-*цис*-ретиналь из глиальной Мюллеровской клетки в наружный сегмент колбочки, где он встраивается в хромофорный центр опсина. Дефект гена RGR может быть связан с аутосомно-рецессивным и аутосомно-доминантным пигментным ретинитом.

Появилось сообщение, пока, правда, не подтвержденное, что в колбочках имеется также и белок RPE65, изомеризующий полностью-транс- ретиналь в темноте. Подробнее об этом см. [16]. Если это так, то, следовательно, в колбочках возможна как фото-, так и темновая регенерация зрительного пигмента. Иными словами, для позвоночных становится очевидной взаимосвязь классических и неклассических (светозависимых) зрительных циклов (см. [17]). Более того, судя по всему, в клетках РПЭ, наряду с классической, темновой изомеризацией полностью-транс-ретинола в его 11-цисформу с помощью фермента RPE65 возможна и его фотоизомеризация. Подробнее см. [18].

Таким образом, в образовании 11-цис-ретиналя как хромофорной группы зрительных пигментов принимают участие четыре типа клеток: наружные сегменты палочек и колбочек, клетки РПЭ и Мюллеровские клетки.

При этом, если до последнего времени считалось, что за регенерацию родопсина в палочках отвечают клетки РПЭ, а за регенерацию зрительных пигментов в колбочках – Мюллеровские клетки, то сейчас становится все более очевидной взаимосвязь и взаимозависимость классического, темнового и неклассического светового циклов регенерации.

Зрительный, или родопсиновый цикл: патология

Дефекты многих генов, участвующие в зрительном цикле, связаны с наследственными заболеваниями сетчатки. Важным патогенетическим фактором некоторых из этих заболеваний является избыточное накопление свободного полностью-транс-ретиналя и образующихся из него побочных продуктов – бис-ретиноидов.

Так, например, мутации в гене, кодирующем переносчик полностью-транс-ретиналя ABCA4, вызывают болезнь Штарградта, а также могут вызывать некоторые формы аутосомно-рецессивной колбочково-палочковой дистрофии и аутосомно-рецессивной пигментный ретинит. Это означает, что мутации в этом гене, приводящие в том числе к накоплению ретиналя и бис-ретиноидов, могут проявляться в различных формах заболеваний сетчатки. Подробнее см. обзоры [19,20]. Иными словами, мутации в одном гене могут проявляться в различных формах заболеваний сетчатки, а мутации во многих генах могут приводить к клинически сходным фенотипам заболеваний. Вместе с тем более сложная картина возникает при таких мультифакторных заболеваниях, как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), когда процессы старения и факторы внешней среды вносят в развитие этого самого распространенного заболевания существенный вклад.

Как уже было сказано выше, первым ферментативным шагом зрительного цикла является превращение в наружных сегментах фоторецепторов полностью-транс-ретиналя в полностью-транс-ретинол. Фоторецепторная ретинолдегидрогеназа (RDH8) отвечает за это превращение. In vivo эффективная функция RDH8 зависит от транспортера ABCA4. Взаимозависимость этих двух белков, ответственных за быстрое удаление полностью-транс-ретиналя из фоторецепторной мембраны и его превращение в полностью-транс-ретинол было отчетливо продемонстрировано на примере Rdh8 -/-Abca4 -/- мышей, у которых происходило быстрое накоплению бис-ретиноидов и которые оказались исключительно чувствительны к световому повреждению, приводящему к дегенерации сетчатки [21].

В целом, нарушения уже на первой стадии родопсинового цикла – будут ли это наследственные дефекты белков, участвующих в удалении свободного полностью-транс-ретиналя из наружного сегмента, или избыточное обесцвечивание родопсина слишком ярким или длительно действующим светом, – приводят к избыточному накоплению в наружном сегменте как свободного полностью-транс-ретиналя. Опасность накопления в наружном сегменте полностью-транс-ретиналя связана как с его собственной токсичностью и фототоксичностью, так и с образованием бисретиноидов – продуктов взаимодействия сначала одной, а затем и второй молекулой ретиналя с фосфолипидом – фосфатидилэтаноламином, которые также токсичны и фототоксичны.

Исходя из принципиальной важности для молекулы зрительного пигмента наличия хромофорной группы (в норме 11-цис-ретиналя), с одной стороны, и предотвращения накопления полностью-транс-ретиналя в результате фотолиза зрительного пигмента, с другой стороны, в настоящее время активно разрабатываются две стратегии фармакологического вмешательства. Первая, при дефекте родопсинового цикла, – это доставка извне хромофорной группы к хромофорному центру опсина, куда он должен встроиться и таким образом регенерировать зрительный пигмент, минуя цикл. Вторая, чтобы предотвратить накопление полностью-транс-ретиналя, – это ингибирование работы родопсинового цикла или перехват свободного полностью-транс-ретиналя.

В случае первой стратегии – доставки извне хромофорной группы зрительного пигмента в наружный сегмент – используется не сам 11-цис-ретиналь, который крайне нестабилен, а 9-цис-ретиналь, который с успехом выполняет роль хромофорной группы зрительных пигментов. Он достаточно легко синтезируется и намного стабильнее. Успешные доклинические испытания на животных моделях, несущих мутации в гене RPE65 и неспособных изомеризовать полностью-транс-ретиналь, позволили перейти к клиническим испытаниям, результаты которых оказались обнадеживающими [22].

Вторая стратегия замедления развития дегенеративных заболеваний сетчатки основана на подавлении работы зрительного цикла, что должно приводить к уменьшению накопления в наружных сегментах фоторецепторных клеток как самого свободного полностью-транс-ретиналя, так и бисретиноидов, которые и токсичны, и фототоксичны. В рамках этой стратегии – предотвращении накопления полностью-транс-ретиналя – ведется поиск препаратов, способных задержать развитие дегенеративных заболеваний сетчатки, в первую очередь болезни Штаргардта и т. н. «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации (ВМД) сетчатки. Подробнее см. [11].

В качестве мишени для ингибирования зрительного цикла был избран RPE65 – ключевой, как было уже сказано, фермент родопсинового цикла, изомеризующий полностью-транс-ретинол в его11-цис-изомерную форму. Кроме того, активность RPE65 связана с накоплением в клетках РПЭ липофусциновых гранул [23], стимулирующих развитие дегенеративных заболеваний сетчатки (подробнее об этом см. ниже). Именно поэтому на ингибировании активности RPE65 основана в последнее время стратегия поиска препаратов, способных задержать развитие дегенеративных заболеваний сетчатки, в первую очередь болезни Штаргардта и т. н. «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации (ВМД) сетчатки. Для подавления активности RPE65 были использованы препараты из семейства ретиниламина/эмиксастата. Эмиксустат оказался на порядок мощнее ретиниламина, и его эффективность была продемонстрирована в 1-й и 2-й фазах клинических испытаний [24]. Правда, эмиксустат оказался недостаточно эффективным в отношении сухой формы ВМД, однако он весьма перспективен для лечения других форм заболеваний, как например болезни Штаргардта и диабетической ретинопатии [25]. Следует подчеркнуть, что подавление родопсинового цикла и регенерации зрительных пигментов путем прямого ингибирования RPE65 в качестве терапевтической стратегии чревато целом рядом неблагоприятных последствий. Поэтому гораздо предпочтительнее был бы перехват

ретиналя и предотвращение его накопления в наружном сегменте. На это неправлены сейчас усилия целого ряда лабораторий и компаний. Оказалось, в частности, что молекулы семейства ретиниламина/эмиксастата обладают, помимо прямого подавления активности RPE65, способностью к перехвату свободного полностью-транс-ретиналя [26].

Таким образом, перехват свободного полностью транс-ретиналя и, как следствие, предотвращение образования из него бис-ретиноидов представляется важным и для замедления развития многих форм дегенеративных заболеваний сетчатки, и, особенно, для предотвращения опасности вызванной светом дегенерации сетчатки (подробнее об этом см. [27, 11].

Ретиноиды и липофусциновые гранулы

Ретиноиды (бисретиноиды, они же и флуорофоры, поскольку обладают сильной флуоресценцией) образуются как побочный продукт фотолиза молекулы зрительного пигмента (рис. 2). Образуются они в том случае, когда нарушен механизм удаления из фоторецепторного дика свободного полностью-транс-ретиналя. Схема образования одного из самых распространенных бисретиноидов – A2E как результат реакций двух молекул полностью-транс-ретиналя (альдегида витамина А) с фосфатидилэтаноламином представлена на рис. 3. При поглощении света бисретиноидов (как пример на рис. 4 представлено фотоокисление A2E) подвергаются фотоокислению и фотодеградации. Продукты фотоокисления и фотодеградации токсичны и представляют для клетки существенную опасность (см. ниже).

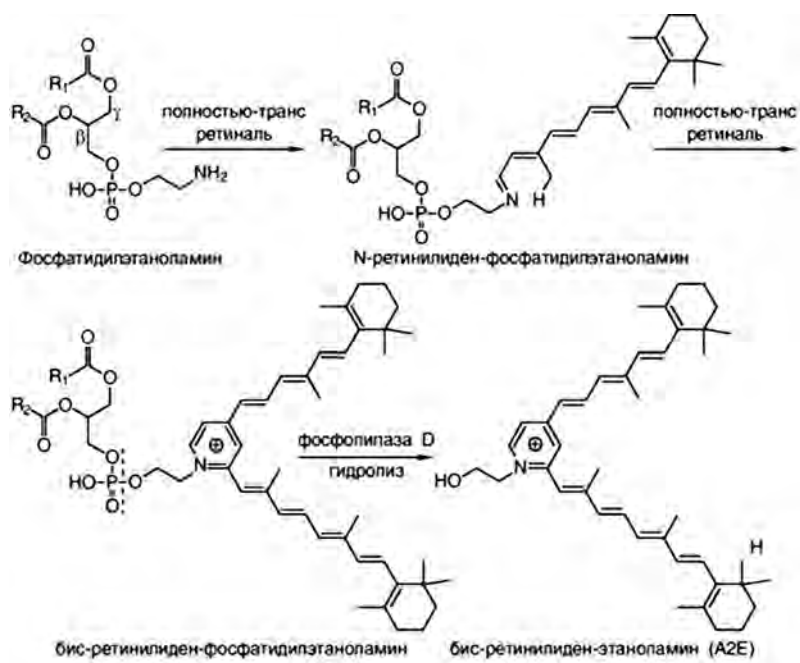

Рисунок 3. Схема синтеза бисретиноида A2E

Сначала одна молекула полностью-транс-ретиналя взаимодействует с фосфатидилэтаноламином, затем присоединяется вторая молекула полностью-транс-ретиналя, в результате чего образуется, в конечном счете, молекула бисретиноида A2E.

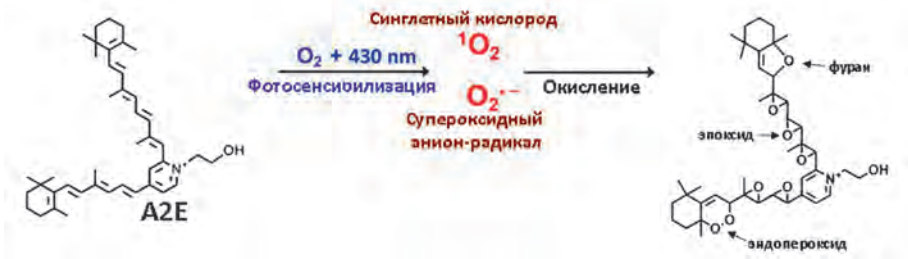

Рисунок 4. Схема фотоокисления бисретиноида A2E

В результате фотоокисления бисретиноида (A2E) с участием активных форм кислорода образуются продукты, представляющие для клетки существенную опасность, в том числе пролонгированную опасность и в темноте.

Бисретиноиды образуются в фоторецепторных клетках и затем переходят в клетки РПЭ. Принципиально важно, что бисретиноиды в составе липофусциновых гранул способны генерировать активные формы кислорода, что было впервые обнаружено нами еще в начале 90-х годов [28, 29].

Бисретиноиды в составе липофусциновых гранул («пигмента старости») накапливаются с возрастом в клетках РПЭ здоровых глаз, и при патологии происходит их массивное накопление. В небольшом количестве бисретиноиды обнаруживаются и в нейральный части сетчатки. Результаты большого числа исследований указывают на патогенетическую роль бисретиноидов в дегенеративных заболеваниях сетчатки. Широко распространено представление о патогенетической роли бисретиноидов и в случае ВМД. В этой связи интерес представляет недавнее исследование, в котором обнаружено существенное различие между содержанием бисретиноидов (A2E, окисленный A2E и два промежуточных продукта) в макулярной (колбочковой) и периферической (палочковой) областями здоровой сетчатки: содержание неокисленных и окисленных бисретиноидов в макуле оказалось меньше, чем на периферии [30]. Поскольку при ВМД основной областью поражения является макула, то важная патогенетическая роль бисретиноидов в отношении ВМД ставится под сомнение. Вместе с тем и в здоровой стареющей макуле, и в макуле пациентов с ВМД обнаруживается высокое содержание меланолипофусциновых гранул, особенно в фовеа. Роль же меланолипофусциновых гранул в патогенезе ВМД остается неизученной.

Поскольку бисретиноиды в основном концентрируются в липофусциновых гранулах РПЭ, играющих важную роль не только в старении, развитии дегенеративных заболеваний и фотоповреждении сетчатки, но и в офтальмологической диагностике, остановимся подробнее на биологии этих гранул.

РПЭ представляет собой монослой гексагональных клеток между фоторецепторными клетками сетчатки и сосудистой оболочкой глаза. Функции

РПЭ многообразны. Помимо участия в регенерации зрительного пигмента родопсина в палочках, а также и в колбочках, он выполняет несколько важнейших для зрения функций, а именно: фагоцитоз обломков наружных сегментов фоторецепторных клеток, обеспечивает гемато-ретинальный барьер, поглощение рассеянного света, регуляцию и поддержание водного и ионного балансов в субретинальном пространстве, формируют иммунную толерантность сетчатки. Нарушения функционирования или гибель клеток РПЭ приводят к заболеваниям сетчатки, которые широко распространены, трудно поддаются лечению и являются ведущей причиной слепоты и слабовидения.

Что касается фагоцитарной функции РПЭ, то она связана с постоянным обновлением наружного сегмента фоторецептора. Полное обновление происходит за 10-14 дней. Обновление – это борьба с накапливающимися в наружном сегменте дефектами, что необходимо для нормального функционирования молекулярной машинерии фототрансдукции. Обновление состоит в том, что апикальная часть наружного сегмента обламывается и фагоцитируется клеткой РПЭ. При этом новые фоторецепторные диски с молекулами родопсина синтезирующиеся во внутреннем сегменте, перемещаются в базальную часть наружного сегмента и далее в его апикальную часть. В клетке РПЭ фагоцитированные обломки наружного сегмента (фагосомы) сливаются с лизосомой, образуя фаголизосому. Однако постоянный процесс «переваривания» фагосом оказывается для лизосомальной системы РПЭ слишком тяжелым бременем.

В результате происходит медленное, в течение десятилетий накопление «недопереваренного» материала – липофусциновых гранул. Из этого следует, что лизосомальная дисфункция является ключевым событием в механизмах старения и патогенеза дегенеративных заболеваний сетчатки. Накопление липофусциновых гранул в РПЭ, как уже говорилось, является отличительным признаком болезни Штаргардта, ВМД и ряда других дегенеративных заболеваний сетчатки. Их избыточное накопление регистрируется с помощью современного диагностического неинвазивного метода – аутофлюоресценции глазного дна. Важно подчеркнуть, что избыточное накопление липофусциновых гранул – это не только маркер старения и патологии сетчатки, но и патогенетический фактор.

Хорошо известная опасность повреждающего действия света на сетчатку и РПЭ, особенно в коротковолновой области спектра, т. н. «blue light hazard», прямо связана с фототоксичностью липофусциновых гранул [31, 32, 27]. Об этом свидетельствует, в частности, спектр действия фотоповреждения, определенный в многочисленных биохимических, цитологических, электрофизиологических и психофизиологических исследованиях, из которого следует, что потенциально опасна именно коротковолновая часть видимого спектра, в которой поглощают свет ретиноиды (рис. 5). Частичная фильтрация этой части спектра (интраокулярные линзы, очки, свето-гигиенические мероприятия) способны оказать защитное, профилактическое действие [33-35].

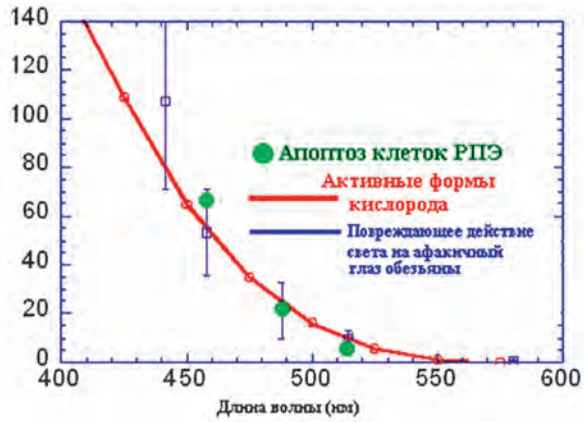

Рисунок 5. Спектральная зависимость (спектр действия) образования активных форм кислорода, падения электроретинограммы афакичного глаза обезьяны и апоптоза клеток РПЭ

Исходя из этого, нами в середине 80-х годов были предложены окрашенные, желтоватые интраокулярные линзы «Спектр», которые гораздо эффективнее, чем ультрафиолетпоглощающие, защищают сетчатку от опасности фотоповреждения и которые нашли широкое применение в офтальмологической практике (рис 6) [36].

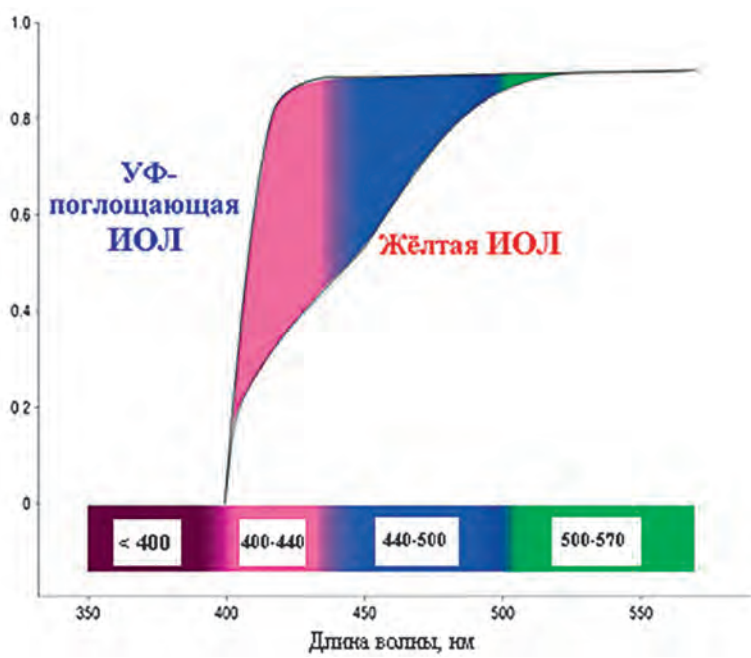

Рисунок 6. Спектры пропускания УФ-абсорбирующей и желтой (ИОЛ «Спектр») интраокулярных линз

Что касается диагностического метода – аутофлюоресценции глазного дна, то в его основе лежит регистрация аутофлуоресценции флуорофоров, содержащихся в основном в ЛГ (см. обзор [37]).

Как мы показали, в качестве диагностического параметра может быть использована не только интегральная интенсивность аутофлуоресценции, но и ее спектральные характеристики, поскольку в случае патологии образуется повышенное содержание окисленных продуктов флуорофоров ЛГ, которые флуоресцируют в более коротковолновой области спектра [38]. На регистрации различий положений максимумов спектров аутофлуоресценции неокисленных и окисленных флуорофоров ЛГ нами предложен диагностический критерий патологического состояния глаза, в основе которого лежит сравнение интегральных интенсивностей флуоресценции в двух спектральных диапазонах – 530–580 нм и 600–650 нм (рис.7) [39,40].

Цитотоксическое действие окисленных бисретиноидов (флуорофоров), как нами недавно было показано, проявляется и в темноте, в отдаленный период после их образования [41, 42].

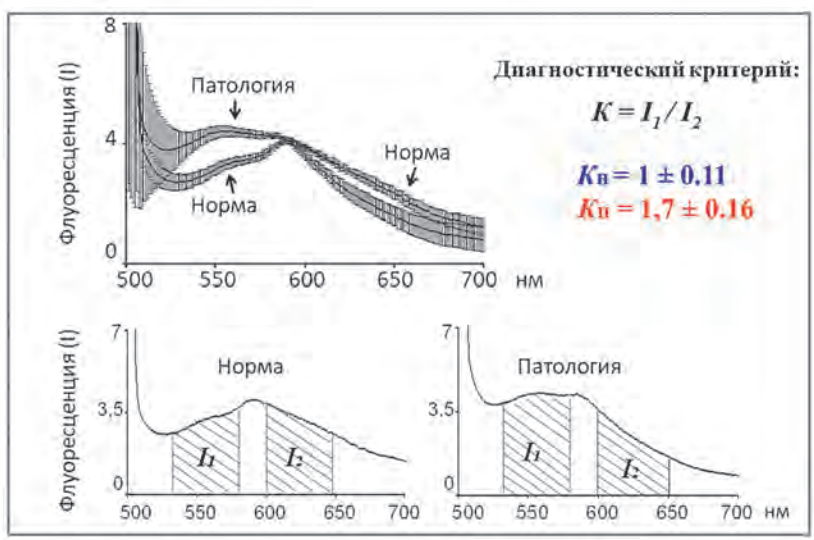

Рисунок 7. Диагностический критерий патологического состояния глаза на основе сравнения флуоресценции неокисленных и окисленных бисретиноидов ЛГ
Вверху – усредненные спектры флуоресценции суспензии клеток РПЭ кадаверных глаз человека в норме и при ВМД. Длина волны возбуждения – 488 нм.
Внизу – индивидуальные спектры флуоресценции суспензии клеток РПЭ кадаверного глаза человека в норме и при ВМД. Длина волны возбуждения – 488 нм.

Соотношение интегральных интенсивностей флуоресценции в двух спектральных диапазонах I1 (530–580 нм) и I2 (600–650 нм) для нормального и патологического глаза принято в качестве диагностического критерия – K= I1/I2

Помимо интегральной интенсивности и различий в положении максимумов спектров аутофлуоресценции неокисленных и окисленных флуорофоров

ЛГ, их функциональным свойством является время жизни флуоресценции, которое не зависит от их концентрации, а напрямую отражает изменения квантового выхода флуоресценции неокисленных и окисленных форм флуорофоров. В последние годы в этом направлении предпринимаются большие усилия. Речь идет о новом виде офтальмоскопии – регистрации времени жизни аутофлуоресценции глазного дна (fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO). Эта методика уже была реализована в некоторых пилотных исследованиях и продемонстрировала многообещающие результаты. Например, была показана разница времени жизни аутофлуоресценции между здоровыми глазам и при ВМД [43],пигментном ретините [44], болезни Штаргардта [45], макулярной телеангиэктазии типа 2 [46], а также при диабетической ретинопатии [47] и болезни Альцгеймера [48].

Недавно мы использовали новый метод для исследования функционального состояния ЛГ в культуре клеток РПЭ, который в будущем мог бы найти применение для ранней диагностики дегенеративных заболеваний сетчатки [49]. Речь идет об особом виде флуоресцентной микроскопии – визуализации времени жизни и скорости затухания флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM). В нашем случае речь идет о визуализации в культуре клеток РПЭ (ARPE-19), времени жизни и скорости затухания флуоресценции ЛГ, которым присуща сильная флуоресценция. Этот метод позволил нам различить неокисленные и фотоокисленные ЛГ. Нами было показано, что при фотоокислении ЛГ, фагоцитированных клетками РПЭ (культура клеток ARPE-19), время жизни их флуоресценции увеличивается (рис 8). Появление же окисленных ЛГ, как мы показали ранее (см. выше), свойственно патологии (ВМД). Поэтому не только сдвиг спектра флуоресценции в коротковолновую область, характерный для окисленных ЛГ, но и увеличение времени жизни их флуоресценции, по сравнению с неокисленными ЛГ, может служить ранним диагностическим показателем патологических изменений в РПЭ.

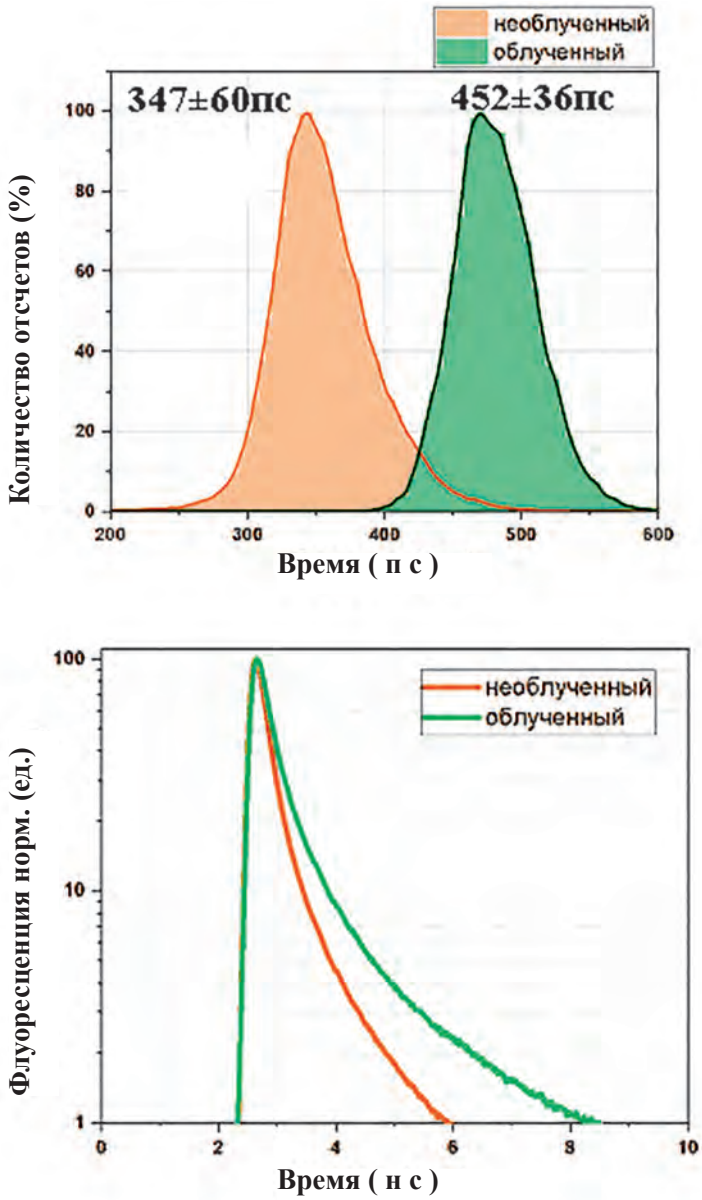

Рисунок 8. Определение времени жизни и скорости затухания флуоресценции ЛГ, фагоцитированных клетками РПЭ (культура клеток ARPE-19), до облучения белым светом и через 48 часов после облучения методом визуализации времени жизни и скорости затухания флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)
Возбуждение флуоресценции при λ 473 нм, детектирование флуоресценции при λ 485 нм. Вверху – распределение времени жизни флуоресценции ЛГ до облучения (неокисленные ЛГ) (закрашено желтым цветом) и через 48 часов после облучения (закрашено зеленым цветом). Внизу – кривые затухания флуоресценции ЛГ до облучения (неокисленные ЛГ) (красная кривая) и через 48 часов после облучения (зеленая кривая).

Поскольку, как указывалось выше, ЛГ являются источником генерации активных форм кислорода (супероксидных радикалов и синглетного кислорода), то уменьшение времени жизни электронно-возбужденнго состяния молекулы, т. е. уменьшение времени жизни флуоресценции, это путь к торможению скорости образования активных форм кислорода и защите клетки от их токсического действия. Одним из природных и эффективных антиокисдантов являются каротиноиды. Именно каротиноиды служат основным антиоксиданом для защиты от фотоповреждений у фотосинтезирующих организмов. Ксантофиллы лютеин и зеаксантин принадлежат к классу каротиноидов. Они являются основными каротиноидными пигментами, содержащимися в сетчатке человека. Благодаря своим антиоксидантным и противовоспалительным свойствам они предложены в качестве потенциальных терапевтических средств, в том числе для задержки развития дегенеративных заболеваний сетчатки (ВМД и ряд других) [50]. Механизм защитного действия зеаксантина включает, во-первых, ингибирование фотоокисления бисретиноидов, в первую очередь A2E, путем тушения синглетного кислорода и радикалов перекисного окисления липидов [51], и, во-вторых, отфильтровывание коротковолновой, фиолетово-синей области спектра, в которой находится максимум спектра поглощения бисретиноидов [52]. Однако антиоксидантное действие зеаксантина в отношении ингибирования фотореактивности ЛГ в РПЭ и задержки развития ВМД оказывается, согласно недавно проведенной оценке, не слишком эффективным [53]. Скорее всего, это связано с высоколипофильной природой лютеина и зеаксантина, не позволяющей их эффективную доставку в клетку. Одним из возможных подходов к преодолению этого препятствия является применение носителей – переносящих белков, по типу ретиноид-переносящих белков в родопсиновом цикле. В сетчатке человека несколько белков были идентифицированы как каротиноидсвязывающие белки, включая глутатион S-трансферазу как зеаксантинсвязывающий белок [54]. Недавно в качестве каротиноидсвязывающего и каротиноидпереносящего белка был предложен белок, ответственный за окраску коконов шелкопряда Bombyx mori; была продемонстрирована его способность к концентрационно-зависимому связыванию, переносу и доставке каротиноидов к модельным мембранам, а также его способность доставлять зеаксантина к фибробластам [55]. Используя методы флуоресцентной микроскопии, включая визуализацию времени жизни флуоресценции ЛГ (метод FLIM), мы попытались применить этот зеаксантин-связывающий белок в качестве носителя для доставки зеаксантина в клетку РПЭ (культура клеток ARPE-19), нагруженную ЛГ, для ее защиты от повреждения, вызванного фотоокисленными ЛГ [49]. Основной полученный результат сводится к следующему: если время жизни флуоресценции фотоокисленных ЛГ увеличивается по сравнению с неоиксленными ЛГ, то при белково-опосредованной доставке зеаксантина время жизни его флуоресценции, т. е. возбужденного состояния, уменьшается (рис. 9). Иными словами, белок, ответственный за окраску коконов шелкопряда Bombyx mori, оказался эффективным носителем для доставки зеаксантина в клетку РПЭ и его взаимодействия с бисретиноидами (флуорофорами) ЛГ. Последующее перераспределение каротиноида в самой клетке и его доставка к ЛГ, вероятно, осуществляется с помощью механизмов эндоцитоза и везикулярного транспорта [56].

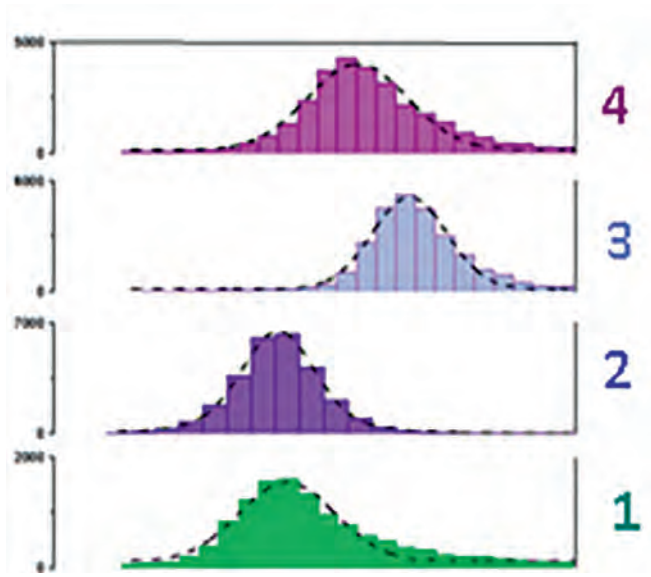

Рисунок 9. Добавление комплекса зеакстантин-белок в культуру клеток ARPE-19, содержащих ЛГ, приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции ЛГ, вызванной облучением белым светом

Метод визуализации времени жизни и скорости затухания флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM).

Возбуждение флуоресценции при λ 473 нм, детектирование флуоресценции при λ 530 нм.

Распределение времени жизни флуоресценции ЛГ:

1 – необлученный образец, контроль,

2 – необлученный образец в присутствии комплекса зеакстантин-белок, 200 нМ,

3 – облученный белым светом образец без добавления комплекса зеакстантин-белок,

4 – облученный белым светом образец в присутствии комплекса зеакстантин-белок, 200 нМ.

Таким образом, используя новый метод – визуализацию времени жизни флуоресценции ЛГ (метод FLIM), оказалось возможным, во-первых, зарегистрировать времена жизни флуоресценции неокисленных и фотоокисленных ЛГ в клетках РПЭ, что может быть использовано в качестве дополнительного инструмента в предварительной флуоресцентной диагностике патологий сетчатки, ее окислительного стресса и, во-вторых, удалось показать, что белково-опосредованная доставка зеаксантина влияет на функциональное состояние ЛГ, уменьшая время жизни их возбужденного состояния, т. е. зеаксантина, действует как эффективный антиоксидант. Помимо этого, доставка зеаксантина в сетчатку и РПЭ – это, по существу, доставка светофильтра, отсекающего потенциально опасную для них фиолетово-синюю.

Заключение

Все вышеизложенное демонстрирует тот важный и общеизвестный факт, что только глубокое понимании механизма физиологической функции в норме, в данном случае первичного процесса зрения, позволяет понять природу нарушений, приводящих к патологии, и только после этого осознанно подойти к диагностике, терапии и профилактике. Это очевидный путь от физиологии к клинической физиологии.

Список литературы:

1. *Г.Р. Каламкаров, М.А.* Островский Молекулярные механизмы зрительной рецепции. //Наука, М. 2002. С.1– 280
[*G.R. Kalamkarov, M.A.* Ostrovsky Molecular mechanisms of visual reception. //Nauka, M. 2002. S.1– 280. (In Russ.)].
2. *М.А. Островский, Т.Б. Фельдман* Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1071– 1090.
[*M.A. Ostrovsky, T.B.* Feldman Chemistry and molecular physiology of vision: photosensitive protein rhodopsin // Advances in Chemistry. 2012. V. 81. No. 11. C. 1071–1090. (In Russ.)].
3. *Архипова Л.Т., Островский М.А., Зайцева Н.С. и др.* Гуморальные антитела и сенсибилизированные лимфоциты к водорастворимым белковым фракциям клеток пигментного эпителия и наружных сегментов зрительных клеток сетчатки при симпатической офтальмии, Офтальмологический журнал, 1982, (1), 13– 16.
[*Arkhipova L.T., Ostrovsky M.A., Zaitseva N.S.* Humoral antibodies and sensitized lymphocytes to water-soluble protein fractions of pigment epithelial cells and outer segments of retinal visual cells in sympathetic ophthalmia, Ophthalmological Journal, 1982, (1), 13– 16. (In Russ.)].
4. *Зайцева Н.С., Слепова О.С., Каламкаров Г.Р. и др.* Аутоаллергические реакции к S-антигену сетчатки при различных клинических формах увеита. Вестник офтальмологии, 1986, (1), 37– 39.
[*Zaitseva N.S., Slepova O.S., Kalamkarov G.R. and others.* Autoallergic reactions to the S-antigen of the retina in various clinical forms of uveitis, Bulletin of Ophthalmology, 1986, (1), 37– 39. (In Russ.)].
5. *Слепова О.С., Зайцева Н.С., Шевченко Т.Ф. и др.* Способ иммунодиагностики аутоаллергии при увеитах, Авторская заявка СССР на изобретение № 3822741/14 от 26.06.86.
[*Slepova O.S., Zaitseva N.S., Shevchenko T.F. et al.* Method for immunodiagnosis of autoallergy in uveitis, USSR Author's application for invention No. 3822741/14 dated 06.26.86. (In Russ.)].
6. *Слепова О.С., Зайцева Н.С., Каламкаров Г.Р. и др.* Аутоиммунные реакции к ретинальному S-антигену у больных с патологией сетчатки различного генеза, Сенсорные системы, 1992, 6, (3), 64–69. IF=0,395
[*Slepova O.S., Zaitseva N.S., Kalamkarov G.R.* Autoimmune reactions to retinal S-antigen in patients with retinal pathology of various origins, Sensory Systems, 1992, 6, (3), 64–69. (In Russ.)].
7. *Архипова Л.Т., Зайцева Н.С., Гундорова Р.А. и др.* Способ диагностики симпатизирующего воспаления глаза, Авторское свидетельство СССР на изобретение № 938995, 1982.

[*Arkhipova L.T., Zaitseva N.S., Gundorova R.A. and others.* A method for diagnosing sympathetic inflammation of the eye, USSR Author's certificate for the invention No. 938995, 1982. (In Russ.)].

8. *Островский М.А.* Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. 106(4): 401–420. DOI:10.31857/S0869813920040056

[*Ostrovsky M.A.* The Molecular Physiology of the Visual Pigment Rhodopsin: Current Trends. Russian Journal of Physiology. 2020. 106(4): 401–420. DOI: 10.31857/S0869813920040056. (In Russ.)].

9. *М.А. Островский, В.А. Надточенко.* Фемтохимия родопсинов. Химическая физика. 2021, том 40, № 4, с. 76–84

[*M.A. Ostrovsky, V.A. Nadtochenko.* Femtochemistry of rhodopsins. Chemical physics. 2021, volume 40, no. 4, p. 76–84. (In Russ.)].

10. *Saari, J. C.* (2012) Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles. Annu. Rev. Nutr. 32, 125–145.

11. *М.А. Островский, Т.Б. Фельдман* Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1071–1090;

[*M.A. Ostrovsky, T.B. Feldman* Chemistry and molecular physiology of vision: photosensitive protein rhodopsin // Advances in Chemistry. 2012. V. 81. No. 11. C. 1071–1090; (In Russ.)].

12. *Molday RS, Garces FA, Scortecci JF et al.* Structure and function of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt macular degeneration. Prog Retin Eye Res. 2022 Jul;89:101036. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.101036. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34954332.

13. *I.B. Fedorovich, K. M. Grant, A. J. Brennan et al.* Photodamage to interphotoreceptor retinoid-binding protein. //In: Structures and Functions of Retinal Proteins. Ed. J.L. Regaud. Colloque INSERM/J.Libbey Eurotext Ltd., 1992. V. 221. P. 275–276.

14. *I.B. Fedorovich, E.M. Semenova, K. Grant et al.* Photosensitized light-induced damage of IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein): Effects on binding properties. //Current Eye Research. 2000. V. 21. No. 6. P. 975–980.

15. *Chen P., Hao W., Rife,L. et al.* (2001a) A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. Nat. Genet. 28, 256–260

16. *Kiser PD, Palczewski K.* Pathways and disease-causing alterations in visual chromophore production for vertebrate vision. J Biol Chem. 2021 ;296:100072. doi: 10.1074/jbc.REV120.014405. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33187985; PMCID: PMC7948990).

17. *Ward, R., Kaylor, J.J., Cobice, D.F. et al.* (2020) Non-photopic and photopic visual cycles differentially regulate immediate, early, and late phases of cone photoreceptor-mediated vision. J. Biol. Chem. 295, 6482–6497).

18. *Kiser PD, Palczewski K.* Pathways and disease-causing alterations in visual chromophore production for vertebrate vision. J Biol Chem. 2021; 296:100072. doi: 10.1074/jbc.REV120.014405. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33187985; PMCID: PMC7948990).

19. *Островский М.А., Фельдман Т.Б., Яковлева М.А. и др.* Зрительный цикл, белок ABCR4 и моногенное заболевание сетчатки глаза – болезнь Штаргарда (методы генной диагностики) // В кн.: «Постгеномные исследования и технологии» под ред. С.Д. Варфоломеева. Изд. МГУ. 2011. С. 376–422.

[Ostrovsky M.A., Feldman T.B., Yakovleva M.A. Visual cycle, ABCR4 protein and monogenic disease of the retina – Stargard's disease (methods of gene diagnostics) // In the book: "Postgenomic research and technology", ed. S.D. Varfolomeev. Ed. Moscow State University. 2011, pp. 376–422. (In Russ.)].

20. *Molday, R.S.* (2015) Insights into the molecular properties of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt disease. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 134, 415–431

21. *Maeda A, Palczewska G, Golczak M, et al.* Two-photon microscopy reveals early rod photoreceptor cell damage in light-exposed mutant mice. PNAS. 2014; 111:E1428–37.

22. *Kenna, P.F., Humphries, M.M., Kiang, A. S. et al.* (2020) Advanced late-onset retinitis pigmentosa with dominant-acting D477G RPE65 mutation is responsive to oral synthetic retinoid therapy. BMJ Open Ophthalmol. 5, e000462

23. *Katz, M.L., Redmond, T.M.* (2001) Effect of Rpe65 knockout on accumulation of lipofuscin fluorophores in the retinal pigment epithelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42, 3023–3030

24. *Dugel, P.U., Novack, R.L., Csaky, K.G. et al.* (2015) Phase ii, randomized, placebo-controlled, 90-day study of emixustat hydrochloride in geographic atrophy associated with dry age-related macular degeneration. Retina 35, 1173–1183.

25. *Rosenfeld, P.J., Dugel, P.U., Holz, F. G. et al.* (2018) Emixustat hydrochloride for geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration: a randomized clinical trial. Ophthalmology 125, 1556–1567

26. *Zhang, J., Kiser, P.D., Badiee, M. et al.* (2015) Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration. J. Clin. Invest. 125, 2781–2794

27. *М.А. Островский* Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения // Успехи биологической химии. 2005. Т. 45. С. 173–204.

[*M.A. Ostrovskii* Molecular mechanisms of the damaging effect of light on the structures of the eye and systems of protection against such damage // Advances in biological chemistry. 2005. V. 45. S. 173–204. (In Russ.)].

28. *Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л. и др.* Способность липофусциновых гранул из ретинального пигментного эпителия глаза человека фотосенсибилизировать окисление липидов при действии видимого света, Сенсорные системы, 1992, 6, (3), 51–54.

[*Ostrovsky M.A., Dontsov A.E., Sakina N.L.* The ability of lipofuscin granules from the retinal pigment epithelium of the human eye to photosensitize lipid oxidation under the action of visible light, Sensory Systems, 1992, 6, (3), 51–54. (In Russ.)].

29. *Boulton, M.; Dontsov, A.; Jarvis-Evans, J. et al.* Lipofuscin Is a Photoinducible Free Radical Generator. J. Photochem. Photobiol. B: Biol 1993, 19, 201–204.

30. *Kotnala A, Senthilkumari S, Wu G, et al.* Retinal pigment epithelium in human donor eyes contains higher levels of bisretinoids including A2E in periphery than macula. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2022; 63(6):6. https://doi.org/10.1167/iovs.63.6.6

31. *Wihlmark, U.; Wrigstad, A.; Roberg, K. et al.* Lipofuscin Accumulation in Cultered Retinal Pigment Epithelial Cells Causes Enhanced Sensitivity to Blue Light Irradiation. Free Radic Biol Med 1997, 22, 1229–1234

32. *Sparrow, J.R.; Nakanishi, K.; Parish, C.A.* The Lipofuscin Fluorophore A2E Mediates Blue Light-Induced Damage to Retinal Pigmented Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, 41, 1981–1989.

33. *Линник Л.Ф., Островский М.А., Зак П.П. и др.* Анализ отдаленных клинико-функциональных результатов имплантации интраокулярной линзы «Спектр», Офтальмохирургия, 1992, (1), 40–44.

[*Linnik L.F., Ostrovsky M.A., Zak P.P. and others.* Analysis of long-term clinical and functional results of implantation of the intraocular lens "Spectrum", Ophthalmosurgery, 1992, (1), 40–44. (In Russ.)].

34. *Meyers S.M., Ostrovsky M.A., Bonner R.F.* A model of spectral filtering to reduce photochemical damage in age-related macular degeneration. Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 102: 83–93. 2004.

35. *Зак П., Егорова Т., Розенблюм Ю., Островский М.* Спектральная коррекция зрения: научные основы и практические приложения. М. Научный мир, 2005.

[*Zak P., Egorova T., Rosenblum Yu., Ostrovsky M.* Spectral correction of: scientific foundations and practical applications. Moscow. Scientific World. 2005. (In Russ)].

36. *С.Н. Федоров, Л.Ф. Линник, П.П. Зак и др.* Искусственный хрусталик глаза. //Авторская заявка на изобретение № 4091431/28-14 от 17.11.1987. Положительное решение от 30.06.1988. Патент ЧССР No.6094-8. (30.10.1989) USA Patent and Trade Mark Office on the claim for No.07/671716 from 18th October 1991.

[*S.N. Fedorov, L.F. Linnik, P.P. Zak et al.* Artificial lens of the eye. //Author's application for invention No. 4091431/28-14 dated 11/17/1987. Positive decision dated 06/30/1988. Patent Czechoslovakia No.6094-8. (10/30/1989) USA Patent and Trade Mark Office on the claim for No.07/671716 dated 18th October 1991. (In Russ.)].

37. *Feldman T.B., Dontsov A.E., Yakovleva M.A., Ostrovsky M.A.* Photobiology of lipofuscin granules in the retinal pigment epithelium cells of the eye: norm, pathology, age. Biophys. Rev. 14, 1051–1065 (2022). https://doi.org/10.1007/s12551-022-00989-9.

38. *Feldman, T.B.; Yakovleva, M.A.; Larichev, A. V. et al.* Spectral Analysis of Fundus Autofluorescence Pattern as a Tool to Detect Early Stages of Degeneration in the Retina and Retinal Pigment Epithelium. Eye (Basingstoke) 2018, 32, 1440–1448, doi:10.1038/s41433-018-0109-0.

39. *Фельдман Т.Б., Островский М.А., Яковлева М.А. и др.* Способ раннего выявления возрастной макулярной дистрофии сетчатки, Патент на изобретение №2651126. Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 18 апреля 2018 г.

[Feldman T.B., Ostrovsky M.A., Yakovleva M.A. et al. Method for early detection of age-related macular degeneration of the retina, Patent for invention No. 2651126. Date of state registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation April 18, 2018 (In Russ.)].

40. *Ларичев А.В., Панченко В.Я., Островский М.А., Фельдман Т.Б.* Оптическое устройство для исследования глазного дна с целью выявления возрастной макулярной дистрофии сетчатки, Патент на полезную модель № 176795. Дата регистрации патента в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 29 января 2018 г.

[*Larichev A.V., Panchenko V. Ya., Ostrovsky M.A., Feldman T.B.* Optical device for examining the fundus to detect age-related macular degeneration of the retina, Patent for utility model No. 176795. Patent registration date in the State Register of Utility Models of the Russian Federation January 29, 2018. (In Russ.)].

41. *Dontsov A.E., Yakovleva M.A., Trofimova N.A. et al.* Water-soluble products of photooxidative destruction of the bisretinoid A2E cause proteins modification in the dark. // Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(3):1534. https://doi.org/10.3390/ijms23031534

42. *Feldman T.; Ostrovskiy D.; Yakovleva M. et al.* Lipofuscin-Mediated Photic Stress Induces a Dark Toxic Effect on ARPE-19 Cells. Int J Mol Sci 2022, 23, 12234, doi:10.3390/ijms232012234.

43. *Sauer, L.; Gensure, R.H.; Andersen et al.* Patterns of Fundus Autofluorescence Lifetimes in Eyes of Individuals with Nonexudative Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2018, 59, AMD65–AMD77, doi:10.1167/iovs.17-23764.

44. *Dysli, C.; Schürch, K.; Pascal, E. et al.* Fundus Autofluorescence Lifetime Patterns in Retinitis Pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2018, 59, 1769–1778, doi:10.1167/iovs.17-23336.

45. *Dysli, C.; Wolf, S.; Hatz, K. et al.* Fluorescence Lifetime Imaging in Stargardt Disease: Potential Marker for Disease Progression. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016, 57, 832–841, doi:10.1167/iovs.15-18033.

46. *Sauer, L.; Gensure, R.H.; Hammer, M. et al.* Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy: A Novel Way to Assess Macular Telangiectasia Type 2. Ophthalmol Retina 2018, 2, 587–598, doi:10.1016/j.oret.2017.10.008.

47. *Schweitzer, D.; Deutsch, L.; Klemm, M. et al.* Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy in Type 2 Diabetic Patients Who Have No Signs of Diabetic Retinopathy. J Biomed Opt 2015, 20, 061106, doi:10.1117/1.jbo.20.6.061106.

48. *Sadda, S.V.R.; Borrelli, E.; Fan, W. et al.* A Pilot Study of Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy in Preclinical Alzheimer's Disease. Eye (Basingstoke) 2019, 33, 1271–1279, doi:10.1038/s41433-019-0406-2.

49. *Semenov, A.N.; Maksimov, E.G.; Moysenovich, A.M.; Yakovleva, M.A.; Tsoraev, G.V.; Ramonova, A.A.; Shirshin, E.A.; Sluchanko, N.N.; Feldman, T.B.; Rubin, A.B.; et al.* Protein-Mediated Carotenoid Delivery Suppresses the Photoinducible Oxidation of Lipofuscin in Retinal Pigment Epithelial Cells. Antioxidants 2023, 12, 413. https://doi.org/10.3390/ antiox12020413

50. *Mrowicka, M.; Mrowicki, J.; Kucharska, E. et al.* Lutein and Zeaxanthin and Their Roles in Age-Related Macular Degeneration – Neurodegenerative Disease. Nutrients 2022, 14.

51. *Rózanowski, B.; Cuenco, J.; Davies, S. et al.* The Phototoxicity of Aged Human Retinal Melanosomes. Photochem Photobiol 2008, 84, 650–657, doi:10.1111.

52. *Roberts, J.E.; Dennison, J.* The Photobiology of Lutein and Zeaxanthin in the Eye. J Ophthalmol 2015, 2015, doi:10.1155/2015/687173.

53. *José, R.; Torres, A.; Correa, C.R.* The Role of Non-Enzymatic Antioxidants on Age-Related Macular Degeneration. Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research 2022, 5, 1–19, doi:10.15761/FDCCR.1000157

54. *Bhosale, P.; Larson, A.J.; Frederick, J.M. et al.* Identification and Characterization of a Pi Isoform of Glutathione S-Transferase (GSTP1) as a Zeaxanthin-Binding Protein in the Macula of the Human Eye. Journal of Biological Chemistry 2004, 279, 49447–49454, doi:10.1074/jbc.M405334200.

55. *Sluchanko, N.N.; Slonimskiy, Y.B.; Egorkin et al.* Silkworm Carotenoprotein as an Efficient Carotenoid Extractor, Solubilizer and Transporter. Int J Biol Macromol 2022, 223, 1381–1393.

56. *Murillo, A.G.; Hu, S., Fernandez, M.L.* Zeaxanthin: Metabolism, Properties, and Antioxidant Protection of Eyes, Heart, Liver, and Skin. Antioxidants 2019, 8, doi:10.3390/ antiox8090390.

Глава 9. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ

Космическая медицина: от физиологии экстремальных состояний к сохранению здоровья здорового человека в экстремальных условиях

О.И. Орлов, Л.Б. Буравкова

Становление космической медицины происходило на фоне решения серьезных задач в области изучения адаптации организма человека к экстремальным воздействиям (авиационные полеты, гипоксия, повышенная и пониженная температура, перегрузки, радиация и др.). Медицина военного времени дала мощный толчок к становлению авиационной и подводной физиологии и медицины, которым предстояло не только дать ответ на вопрос о механизмах развития патологических состояний в условиях измененного спектра внешних факторов, но и найти пути компенсации развития неблагоприятных изменений в организме человека, а также лечения/реабилитации при развитии патологии.

Значительный вклад в развитие космической физиологии и медицины внесли выдающиеся исследования академика Л.А. Орбели и его научной школы в области экологической, экстремальной и авиационной физиологии. Были сформулированы принципиальные положения, связанные с решением физиологических и гигиенических проблем обеспечения полетов в стратосферу [1], которые в дальнейшем были использованы для подготовки суборбитальных ракет. В 1943 г. академик Л.А. Орбели возглавил московский филиал Военно-медицинской академии, в состав которого вошел Институт авиационной медицины, который в последующем решал задачи обоснования возможности полетов человека на ракетных летательных аппаратах и разрабатывал средства обеспечения медицинской безопасности. Необходимо отметить, что в разработке и обсуждении программы исследования влияния факторов суборбитального полета на основные жизненные функции подопытных животных активно участвовали Академия наук и Академия медицинских наук СССР. В апреле 1956 г. в Академии наук СССР состоялась Всесоюзная конференция по ракетным исследованиям верхних слоев атмосферы, на которой обсуждался проект пилотируемого корабля-спутника под руководством С.П. Королева [2].

Подготовка первых пилотируемых космических полетов полностью легла на плечи авиационных врачей, хорошо знакомых с факторами авиационного полета, такими как гипобария и перегрузки. Естественно, в основу отбора и тренировок космонавтов были положены исследования индивидуальной переносимости и адаптации к гипоксии, перегрузкам, физическим нагрузкам, изоляции, психо-эмоциональному стрессу и другим экстремальным

факторам. Большинство разработанных тестов используется до сих пор, продолжая раскрывать механизмы развития патологических состояний человека при выходе его за пределы комфортных параметров среды обитания. Таким образом, космическая медицина вносит неоценимый вклад в развитие клинической физиологии, изучая и устанавливая границы функционирования физиологических систем здорового организма в экстремальных условиях.

Поскольку основные факторы открытого космического пространства выходят далеко за пределы возможностей сохранения жизни человека, было понятно, что без создания герметически замкнутых объектов ни освоение, ни покорение космоса невозможно. Конструкторы первых суборбитальных ракет и орбитальных кораблей спутников с живыми организмами различной степени организации подтвердили возможность космического полета с разработанными системами жизнеобеспечения сначала на лабораторных животных, а потом и человека. Разработка, усовершенствование и создание новых технических систем жизнеобеспечения замкнутых объектов продолжается в настоящее время, с учетом полученного опыта космических полетов и наземных экспериментов в герметически замкнутых объектах.

Защита от внешних экстремальных факторов и создание привычных условий для жизни и работы человека на высоте 400 км оставила для медицинского обеспечения функцию мониторинга и контроля среды обитания космических кораблей и орбитальных станций, а также поддержания здоровья и высокого уровня работоспособности членов экипажей. В настоящее время, как и 80 лет назад, только один фактор космического полета невозможно исключить или компенсировать. Это – невесомость (или микрогравитация), которая постоянно сопровождает человека, преодолевшего земную гравитацию и вышедшего на космическую орбиту.

Известно, что невесомость (микрогравитация) является основным фактором, обуславливающим развитие изменений в физиологических системах организма в условиях космического полета (КП). Устранение веса, гравитационно-зависимых деформаций и механического напряжения структур тела сопровождается в невесомости глубокими изменениями активности афферентных систем (прежде всего – вестибулярной, опорной, проприоцептивной) [3], устранением гидростатического давления жидких сред организма, снятием весовой нагрузки на костно-мышечную систему. Эти факторы, в свою очередь, являются триггерами последующих адаптивных сдвигов в различных системах организма. Наступающее в первые несколько часов пребывания в невесомости перераспределение жидких сред организма в краниальном направлении и временное увеличение центрального венозного давления считается основной причиной ранних адаптивных реакций сердечно-сосудистой, эндокринной и выделительной систем организма [4].

Важная роль в адаптации принадлежит регуляторным гомеостатическим системам: эндокринной и иммунной. Эндокринная система в процессе адаптации изменяется на всех уровнях: меняются активность синтеза/секреции гормона, депонирование гормонов, органный метаболизм, параметры связывания со специфическими рецепторами в тканях-мишенях [5]. В процессе адаптации меняется временная организация активности регуляторных систем.

Анализ показателей эндокринного и иммунного статуса позволил установить, что под действием условий измененной гравитации в организме формируется комплекс сочетанных изменений, характеризующийся многочисленными корреляционными зависимостями как свидетельствами тесной связи этих систем.

Дискуссии о том, как расценивать наблюдаемые в различные периоды КП сдвиги – как адаптационные или патологические, возникали периодически, поскольку очень часто у здорового человека развивалась клиническая картина заболевания. Например, различные симптомы болезни движения наблюдаются у всех космонавтов и астронавтов в первые дни КП. Прием противоукачивающих фармакологических препаратов значительно облегчает состояние здоровья в этих условиях. Время естественной адаптации вестибулярного аппарата к необычным условиям, как правило, составляет несколько дней. В короткой главе нет возможности подробно рассматривать все физиологические эффекты невесомости и обсуждать клинические проявления патологических процессов в условиях космического полета. В качестве примера поступательного анализа механизмов физиологических изменений в условиях отсутствия гравитации мы остановимся на двух важных системах, изменения в которых проявляются на разных этапах пребывания в невесомости: водно-электролитный обмен и состояние костной ткани. В обоих случаях изучение механизмов адаптации к условиям измененной гравитации имело целью обоснование перспективных средств и методов коррекции нарушений в основных физиологических системах.

Условно можно выделить три группы физиологических сдвигов, развивающихся во время космических полетов. 1. Срочные физиологические реакции, наблюдаемые в начальный период космического полета: вестибулярные расстройства, изменения сердечно-сосудистой системы и водно-электролитного обмена. 2. Длительные полеты приводят к атрофическим изменениям в скелетных мышцах (особенно, антигравитационных, участвующих в поддержании позы) и костной ткани (особенно в длинных трубчатых костях ног), а также снижению тонуса сосудов. 3. К третьей группе относятся интегративные эффекты таких физиологических систем, как иммунитет, центральная нервная система, гормональная регуляция и др.

Большой вклад в анализ механизмов наблюдаемых нарушений водно-электролитного обмена в условиях невесомости внесли академики Ю.В. Наточин и А.И. Григорьев. Проведенные под их руководством исследования в космических полетах и в условиях антиортостатической гипокинезии (АНОГ) показали, что изменение объемов жидкостных секторов тела оказывает как прямое, так и опосредованное влияние на многие физиологические функции [6, 7]. Однако изучение водно-солевого обмена в космических полетах затруднено из-за отсутствия неинвазивных и совместимых с условиями полета методов определения объемов жидкостных секторов. Для этой цели был разработан и создан портативный бортовой биоимпедансометр СПРУТ-К, предназначенный для исследования динамики жидкостных объемов у космонавтов как во время пред- и послеполетного обследования, так и непосредственно в космическом полете [10, 11] (Носков В.Б., Николаев Д.В. и др. 2005; Носков В.Б., Ничипорук И.А., Моруков Б.В., и др., 2005). Его прототипом является прибор АВС-01 МЕДАСС, широко

используемый в клинической практике для наблюдения за состоянием гидратационного статуса в клинике, а также в медицине катастроф. Принцип работы прибора основан на использовании зависимости электрического сопротивления тканей организма, измеренного на разных частотах, от объемов жидкостных секторов организма. Преимущества биоимпедансного анализа по сравнению с другими методами определения объемов жидкостных секторов организма человека в условиях космического полета обусловливаются безопасностью, атравматичностью и совместимостью с необычными условиями исследования.

В ранние сроки пребывания в условиях невесомости, как и в условиях гипокинезии, выявлены гипогидратация организма, выраженная в равномерном снижении жидкостных пространств, и характерные изменения состава тела. Причем динамика жидкостных объемов, а также жировой и мышечной массы тела хорошо сопоставимы по характеру и величине. Новые результаты о динамике уровня гидратации организма и состава тела, полученные с помощью биоимпедансного анализа, хорошо согласуются с полученными ранее с применением инвазивных методик и не противоречат устоявшимся теоретическим представлениям о характере адаптации водно-солевого гомеостаза к условиям невесомости.

Исследованию механизмов поддержания гомеостатических констант водно-минерального обмена во время космических полетов были посвящены международные космические эксперименты с участием специалистов России, Франции, Австрии, Словакии и США, проведенные под руководством академика А.И. Григорьева во время непродолжительных (до 25 суток) орбитальных полетов. На борту орбитальной станции «Мир» изучали закономерности и динамику адаптации водно-солевого обмена и его гормональной регуляции в условиях кратковременного воздействия невесомости и в раннем послеполетном периоде [7, 12].

Анализ результатов выполненных исследований показал, что во время раннего периода адаптации к микрогравитации, в начале космических экспедиций существенных изменений ионограммы крови не наблюдалось и практически всегда концентрация основных электролитов (натрия, калия, кальция и магния) в сыворотке крови мало отличалась от дополетного уровня и соответствовала физиологической норме. Экскреция жидкости с мочой во время этих полетов снижалась на 26 %, т. е. в течение первых 4-20 суток пребывания в невесомости диурез был ниже предполетных величин практически у всех космонавтов и астронавтов. Выведение почками основных электролитов и осмотически активных веществ во время пребывания на орбите в среднем существенно не изменялось. У отдельных космонавтов наблюдались периоды как увеличения, так и снижения диуреза и величины экскреции натрия и калия, по сравнению с предполетным уровнем, но эти колебания не были велики и закономерны и, вероятнее всего, обусловливались характером питания и индивидуальным темпом адаптации. В тех случаях, когда в ходе полета регистрировалось потребление жидкости, было выявлено снижение водопотребления. Статистически значимое снижение почечной экскреции натрия наблюдалось в раннем послеполетном периоде (в среднем на 34 %), что, по-видимому, отразилось и на тенденции к снижению выведения осмотически активных веществ

в целом. При этом не наблюдалось значимой динамики скорости клубочковой фильтрации, о которой судили по экскреции креатинина.

В то же время активность основных гормональных регуляторов водного и электролитного обмена, таких как вазопрессин (антидиуретический гормон, АДГ) и гормоны ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в крови во время полета существенно изменялась. В первые 20 суток пребывания в невесомости концентрация вазопрессина в плазме крови возрастала почти у всех обследованных космонавтов и астронавтов в 2-5 раз. Следует отметить, что возрастание активности АДГ наблюдалось при неизменной осмотической концентрации плазмы крови [9].

Кроме того, у большинства обследованных лиц во время полета существенно (в 1,5-4,0 раза) увеличивалось выведение вазопрессина почками по сравнению с фоновым, дополетным уровнем, что свидетельствует о повышенной продукции гормона и об активации во время космического полета гормонального звена антидиуретической системы. При этом осмолярность мочи и почечное выведение основных электролитов заметно не изменялись, но повышенная продукция вазопрессина соотносилась с тенденцией к снижению диуреза. Одновременно отмечалась тенденция к понижению концентрации альдостерона в крови и снижение его экскреции почками во время пребывания в невесомости почти на 37 %, что наряду с некоторой гипоальдостеронемией у большинства обследованных космонавтов, по-видимому, отражает снижение его синтеза. Активность ренина плазмы крови имела тенденцию к увеличению и характеризовалась большими индивидуальными колебаниями. Концентрация атриального натриуретического пептида в плазме крови, важнейшего регулятора водно-солевого обмена и секреции волюморегулирующих гормонов, достоверно не изменялась.

Секреция волюморегулирующих гормонов и, в частности, АДГ и АНП тесно связана с уровнем гидратации организма. В кратковременных полетах определить динамику внутрисосудистого объема жидкости проще, так как при стабильном количестве эритроцитов изменения объема циркулирующей плазмы можно рассчитать исходя из величины показателя гематокрита. Оказалось, что в первые три недели пребывания в условиях невесомости у 76 % космонавтов происходит возрастание гематокрита на 2-16% относительно дополетной величины [10], что соответствует снижению ОЦП в среднем на 15,3%. На 14-е сутки космической миссии объем внеклеточной жидкости, оцененный по распределению брома, также был снижен у трех астронавтов. Эти результаты однозначно указывают на развитие гипогидратации организма в первые две-три недели космического полета.

Складывалось впечатление, что в большинстве случаев к этому моменту полета у космонавтов заканчивался первоначальный период адаптации к условиям невесомости и наблюдались последствия этих ранних приспособительных сдвигов водно-солевого обмена и вторичная гормональная перестройка. Одним из основных свидетельств произошедших изменений является гиповолемия. В исследованиях с фармакологической гипогидратацией организма человека было показано, что уменьшение ОЦП в среднем на 16% способствует снижению центрального венозного давления (ЦВД) и одновременному повышению концентрации гормонов РААС и вазопрессина в плазме крови.

В течение первых суток после окончания непродолжительных космических экспедиций нередко наблюдалась гипернатриемия, увеличенная концентрация общего белка плазмы крови и высокая величина гематокрита, что свидетельствовало о сохраняющемся дефиците плазмы и гипогидратации организма. Потеря массы тела после таких полетов составила 2-4% от исходного уровня. В течение нескольких послеполетных суток у космонавтов отмечался положительный водный баланс, снижение диуреза и натриуреза при одновременном увеличении продукции гормонов, обеспечивающих удержание жидкости и ОАВ. Обычно на третьи сутки реадаптационного периода дефицит массы тела уменьшался или вообще исчезал, а через 7 суток после завершения полета большинство исследованных параметров находилось в пределах предполетных колебаний, что свидетельствовало о том, что реадаптация водно-солевого гомеостаза и системы волюморегуляции к земным условиям к этому сроку в основном завершалась и уровень гидратации организма нормализовался.

Таким образом, проведение серии бортовых экспериментов с целью исследования механизмов волюморегуляции и закономерностей адаптации водно-солевого метаболизма к условиям космического полета показало, что после перехода от условий нормальной гравитации к невесомости происходило снижение уровня гидратации организма. При этом объем внеклеточной жидкости снижался на 18-20%, а объем циркулирующей плазмы – в среднем на 10-20%. В этот же период концентрация вазопрессина в плазме крови в большинстве случаев была значительно выше исходной, а почечная экскреция атриального натрийуретического пептида и альдостерона, наоборот, снижалась.

Несмотря на то что объем экспериментальных исследований, проводимых в условиях космических полетов для выяснения механизмов адаптации начального периода, небольшой, а их результаты во многом зависят от специфики каждого полета, можно сформулировать представление о характерных сдвигах водно-солевого обмена и его гормональной регуляции. В ранний период (от нескольких часов до суток) после перехода от условий нормальной гравитации к невесомости, вероятно, начинает преобладать почечная экскреция жидкости и осмотически активных веществ над их потреблением, что приводит к снижению объема циркулирующей плазмы и развитию гипогидратации организма. Вслед за этим, в ответ на уменьшение объема плазмы, возрастает продукция вазопрессина и снижается секреция АНП, что способствует развитию вторичной реакции, направленной на стабилизацию водно-электролитного гомеостаза при сниженном объеме внеклеточной жидкости, адекватном новым условиям существования человека [6, 10]. Такую перестройку можно квалифицировать как адаптивную реакцию организма в ответ на первичные сдвиги, обусловленные перераспределением жидких сред в краниальном направлении. Причем скорость развития и выраженность этих волюморегулирующих реакций определяются не только объемными сдвигами, но и характером межгормональных взаимодействий.

В раннем послеполетном периоде организм человека вновь подвергается адаптационной перестройке, обусловленной воздействием гравитационной нагрузки. Происходит активация волюморегулирующих гормональных

систем, обеспечивающих удержание в организме жидкости и осмотически активных веществ для восстановления водно-солевого равновесия и адекватных объемов жидкостных сред, соответствующих условиям земной гравитации.

Следует отметить значение индивидуальных особенностей, потому что у каждого из космонавтов наблюдались разные сроки развития адаптационных сдвигов экскреторной деятельности почек и перестройки в системе гормональной волюморегуляции как во время пребывания в условиях невесомости, так и в процессе последующей реадаптации к земной гравитации. Необходимо также иметь в виду свойство волюморегулирующих гормонов быстро менять уровень секреции в ответ на изменение физиологической ситуации. Тем не менее результаты, полученные в непродолжительных космических полетах, демонстрируют характерные сдвиги, наблюдаемые в хорошо контролируемых условиях модельных экспериментов [6, 8, 9] и развивают общепризнанную концепцию адаптации к условиям невесомости. Приведенные данные свидетельствует о сложности комплексных динамических физиологических изменений в условиях отсутствия постоянно действующего на Земле гравитационного фактора.

Как при действии реальной микрогравитации, так и при наземном моделировании ее эффектов у человека и животных развиваются адаптивные изменения во многих физиологических системах организма: в костной, мышечной, дыхательной, сердечно-сосудистой и др. системах. Адаптационные изменения в деятельности этих систем могут быть критическими для сохранения здоровья человека и поддержания адаптивного потенциала его организма, в частности при изменении условий окружающей среды. Выполненные под руководством академика А.И. Григорьева полетные и наземные эксперименты показали, что в костной системе на условия измененной гравитации откликаются процессы как метаболизма костной ткани, так и ее минерализации, осуществляемые под гормональным контролем. Во время реадаптации после возвращения к земной гравитации скорость резорбции кости преобладает над процессами остеосинтеза, являясь основой дополнительной транзиторной остеопении.

Показано, что длительные космические полеты, как и продолжительный постельный режим, сопровождаются уменьшением костной массы, снижением минеральной плотности костей нижней половины скелета (поясничные позвонки, проксимальный эпифиз бедренной кости). В костях верхней половины скелета выявляется тенденция к увеличению содержания минералов («гиперминерализация») [11]. Потери костной массы при гипокинезии длительностью до 4 мес. могут достигать значений, квалифицируемых по Т-критерию как остеопения. Увеличение длительности постельного режима до 6 месяцев и более может сопровождаться развитием остеопороза. Предполагается, что явления остеопении в условиях невесомости и при гипокинезии связаны с общим снижением скорости процессов ремоделирования и обусловлены дефицитом механической стимуляции костной ткани в этих условиях [9, 12]. Известно, что уже на 7-й день пребывания здорового человека в гипокинезии регистрируется повышение почечной экскреции калия, а к концу 2-й недели – это приводит к его отрицательному балансу.

Ограничение двигательной активности ведет к увеличению выведения с мочой из организма кальция, что повышает риск образования почечных камней и костных переломов, а также вызывает снижение функциональной активности С-клеток щитовидной железы и повышение активности паратиреоцитов. Это приводит к дисбалансу гормонов, регулирующих обмен кальция, к торможению новообразования костной ткани. В работе Б.В. Морукова показано, что длительная антиортостатическая гипокинезия приводит к прогрессирующим потерям кальция, которые обусловлены сдвигами метаболизма и процессов остеогенеза в костной ткани, изменениями содержания в крови кальцийтропных гормонов, процессов транспорта кальция в почках и его всасывания в желудочно-кишечном тракте [9]. Стоит отметить, что во время гипокинезии кальций теряется неравномерно из различных костей скелета, в большей степени потери наблюдаются в эпифизах и трабекулярных зонах, в меньшей в диафизах и компактных костях.

За последние десятилетия установлена роль костных морфогенетических белков (BMP), относящихся к гетерогенной группе неколлагеновых протеинов из семейства факторов роста опухолей (TGFβ), которые стимулируют или лимитируют образование костной ткани, а также могут контролировать апоптоз, дифференцировку и пролиферацию костных клеток. Профиль экспрессии генов костных морфогенетических белков был исследован у российских членов экипажей длительных экспедиций на МКС в пред- и послеполетном периодах. Анализ экспрессии генов BMP по средним показателям не выявил в раннем послеполетном периоде статистически значимых изменений по сравнению с фоновыми значениями. Однако при рассмотрении индивидуальных данных была отмечена высокая вариабельность и разнонаправленная динамика изменений экспрессии генов BMP. При этом у некоторых из обследованных космонавтов были выявлены разнонаправленные изменения экспрессии генов, стимулирующих (BMP2) и лимитирующих (BMP3) образование костной ткани. В то же время у других членов экипажей отмечались однонаправленное снижение экспрессии этих генов и активация как процессов костеобразования, так и резорбции в раннем реабилитационном периоде после завершения длительных орбитальных миссий [13]. Следует также отметить, что снижение экспрессии генов BMP4 и BMP7 у членов экипажей может быть связано с большим объемом физических нагрузок, выполняемых во время космического полета в рамках системы профилактических мероприятий.

Остается открытым вопрос о том, как далеко может зайти процесс деминерализации при увеличении длительности полета и может ли быть он скомпенсирован на определенных этапах пребывания человека в условиях микрогравитации. Очевидно, что этот факт может существенно лимитировать продолжительность пребывания человека в космическом пространстве из-за потенциального риска развития остеопороза и сопровождаться негативными последствиями при возвращении в условия земной гравитации. Тем не менее клеточные механизмы наблюдаемых изменений до настоящего времени остаются не до конца ясными.

В настоящее время принято считать, что микрогравитация может блокировать развитие остеобластического фенотипа in vivo с помощью трех возможных механизмов: 1) подавление пролиферативной активности клеток;

2) угнетение дифференцировочных потенций клеток; 3) усиление активности резорбции костной ткани при неизменной пролиферации и дифференцировке клеток. Тем не менее до сих пор ни одна из этих точек зрения не получила достаточного и однозначного подтверждения. Вероятно, можно допустить и то, что на определенных этапах пребывания в условиях микрогравитации эти механизмы могут действовать параллельно или же последовательно сменять друг друга [14, 15].

Особый интерес представляют работы, посвященные изучению уровня экспрессии генов и белковой продукции различных сигнальных молекул и веществ, которые принимают участие в механизмах регуляции жизнеспособности, пролиферации и дифференцировки клеток. В космическом эксперименте, выполненном на остеобластах крысы, было выявлено значительное уменьшение уровня мРНК рецептора PDGF-β, Shc (адапторный протеин для рецепторов факторов роста) и c-fos, тогда как экспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGF) не менялась на пятый день культивирования в условиях микрогравитации [16]. Изменения в системе сигнальной трансдукции и экспрессии ряда регуляторных генов были обнаружены в КП у остеобластов линии MC3T3-E1. Уровень мРНК генов раннего ответа и скелетных факторов роста cox-2, c-myc, bcl-2, TGFβ-1, bFGF, PCNA, остеокальцина, FGF-2 был значительно снижен. Было сделано заключение о том, что покоящиеся остеобласты медленнее входят в митотический цикл при активации в условиях микрогравитации, так как теряют способность адекватно реагировать на анаболические сигналы [17].

Многочисленные изменения в системе сигнальной трансдукции, связанные с уровнем экспрессии белков, участвующих во внутриклеточной сигнализации, были обнаружены у остеобластов крысы после активации клеток витамином 1,25(OH)2D3. Уровень мРНК киназы фокальной адгезии FAK, фосфолипазы C (1 и 2), протеинкиназ Raf, Rho GAP, а также фосфолипазы β был повышен в опытных образцах по сравнению с наземными контролями. Авторы полагают, что дальнейшее исследование процессов фосфорилирования сигнальных молекул может пролить свет на протекание процессов внутриклеточной сигнализации и их взаимосвязь с механотрансдукцией у остеобластов в условиях микрогравитации [18]. Работы, выполненные в течение ряда последних лет, убедительно продемонстрировали, в том числе, и чувствительность культивируемых клеток остеобластического фенотипа к гравитационному фактору [19-21].

При культивировании остеобластов крысы на космическом шаттле в течение четырех или пяти суток определяли уровень мРНК некоторых генов цитоскелета, рецепторов адгезии и дифференцировочных маркеров. Было показано, что микрогравитация приводит к уменьшению экспрессии генов α-тубулина и остеопонтина, но вызывает увеличение уровня экспрессии CD44 и небольшое возрастание мРНК остеонектина и фибронектина, при неизменной экспрессии актина, виментина и интегрина (β1). Обнаруженные изменения авторы связывают с адаптивным ответом клеток на снятие механической стимуляции [22].

Очевидно, что все-таки более вероятным сценарием влияния микрогравитации на низкодифференцированные и остеогенные клетки-предшественники

является изменение нормальной реакции клеток на анаболическое действие факторов роста и нарушение в проведении митогенных сигналов в клетки, что выражается в соответствующем угнетении роста культур, по крайней мере на начальных этапах адаптации клеток к условиям пониженной силы тяжести. Поскольку МСК и остеогенные клетки являются низкодифференцированными производными стромы костного мозга, важно проанализировать потенциал некоторых клеток крови, которые ведут свое происхождение от другого типа стволовых клеток мезенхимного происхождения (гемопоэтического ряда), также локализованных в костном мозге. В связи с этим интересно, что гемопоэтические CD34+-прогениторные клетки, выращиваемые в течение 8-13 дней в суспензионной культуре или на подложке из стромальных клеток, демонстрировали 57-84% снижение общего количества клеток в условиях микрогравитации по сравнению с наземными контролями. При этом клетки миелоидной линии, несмотря на ухудшение роста, охотнее дифференцировались в макрофагальном направлении, а эритроидные клетки на фоне сниженного роста, напротив, хуже формировали эритроидные колонии, что было показано в исследованиях по образованию соответствующих колоний в метилцеллюлозной среде [Davis, Wiesmann, Kidwell et al., 1996].

В настоящее время исследователи придерживаются мнения о том, что большинство наблюдаемых клеточных реакций обусловлено не физической потерей числа рецепторов для факторов роста на мембране клеток, которые при связывании с последними (например, EGF, PDGF) обеспечивают переход клеток в фазу пролиферации, а скорее изменениями в системе трансдукции сигналов в условиях микрогравитации [23, 24]. Подкрепленная экспериментально доказанными изменениями в экспрессии ряда регуляторных генов (c-fos, c-jun, cox-2) у различных типов культивируемых клеток, эта точка зрения заставила ученых обратить самое пристальное внимание на возможные внутриклеточные механизмы и пути сигнальной трансдукции, которые могут быть непосредственно вовлечены в этот процесс. В связи с тем, что семейство митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK) занимает ключевое место в регуляции и реализации процессов пролиферации и дифференцировки многих типов клеток, целесообразно подробнее остановиться на роли, которую играют эти киназы в жизнедеятельности ММСК и остеобластов.

Пролиферация и дифференцировка – два важнейших, тесно взаимосвязанных клеточных процесса. В ходе остеогенной дифференцировки некоммитированные МСК, как и более коммитированные остеогенные клетки-предшественники, должны пройти пролиферативную и дифференцировочную фазы, сопутствующие процессу приобретения клетками качественно нового фенотипа. По современным представлениям, главные пути реализации всех трех основных направлений дифференцировки МСК включают активацию/репрессию MAP-киназных каскадов. Показано, что активация классического MAP-киназного каскада (ERK1/2) происходит главным образом через Ras-зависимый путь сигнальной трансдукции в ответ на действие факторов роста [25, 26]. Предполагается, что такие факторы роста как BMP-2 и IGF-I реализуют свое позитивное митотическое влияние на МСК через активацию MAP-киназного каскада. Участие многочисленных компонентов MAPK-каскада показано и для еще одного фактора роста, регулирующего остеогенную дифференцировку МСК

и остеобластов – TGF-β [Hoffmann, Preobrazhenska, Wodarczyk et al., 2005]. Таким образом, самые разнообразные биологически активные вещества и факторы роста, несмотря на различные рецепторы и неодинаковый спектр выполняемых ими функций, имеют конечную точку приложения своего митогенного влияния на МСК и остеогенные клетки в виде МАР-киназного каскада сигнальной трансдукции.

В последнее время появляется все больше аргументов в пользу участия механических сигналов в регуляции пролиферации и дифференцировки МСК. Предполагается, что в этом процессе принимают участие специфические интегрины, которые осуществляют дезактивацию рецепторов для TGF-β и активируют киназы фокальной адгезии, а те в свою очередь МАРК-каскад [Salasznyk, Klees, Williams et al., 2007]. В этой связи необходимо упомянуть, что при изучении уровня экспрессии некоторых компонентов описываемых сигнальных путей у остеобластов – FAK, Raf-киназы (связанной с Ras/MAPK-каскадом) после кратковременного (4-5 суток) КП было найдено возрастание количества соответствующих мРНК, что может свидетельствовать о том, что в условиях микрогравитации происходит нарушение в интегрин-опосредованной сигнализации и, следовательно, клеткам может недоставать имеющегося уровня активности путей проведения митогенных сигналов [17]. Таким образом, необходимо более детальное изучение экспрессии интегринов и других адгезивных рецепторов на мембране ММСК и остеогенных клеток, с тем чтобы прояснить их потенциальную роль в реализации влияния микрогравитации на пролиферацию клеток остеобластического фенотипа.

Согласно полученным данным при 30-дневном клиностатировании происходит более чем 2-кратное снижение экспрессии таких генов-маркеров остеодифференцировки как *ALPL-1* (щелочная фосфатаза) и *Col1-A1-1* (коллаген I типа), что согласуется с работами, указывающими на снижение остеогенного потенциала МСК в условиях моделированной микрогравитации. При этом происходило возрастание экспрессии PPARγ, продукт которого является ключевым фактором транскрипции для адипогенной дифференцировки и супрессирует транскрипцию генов остеогенного пути.

Анализ уровня экспрессии генов-маркеров «стволовости» *SOX2, OCT4, NANOG* при клиностатировании выявил 2-3-кратное снижение. Продуктами данных генов являются транскрипционные факторы, необходимые для самоподдержания и сохранения мультипотентного состояния. Наличия мРНК гена TERT, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы, не обнаружено ни в одном из образцов, что подтверждает точку зрения об отсутствии в МСК человека выраженной теломеразной активности [15]. Это подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о предрасположенности стромальных предшественников к коммитированию в адипоцитарном направлении в условиях пониженного гравитационного воздействия.

Известно, что умеренные физические нагрузки необходимы для нормального гомеостаза костной ткани, поддержания тонкого баланса между двумя постоянно протекающими, тесно сопряженными физиологическими процессами – костеобразованием и резорбцией, реализующими функциональную адаптацию костной ткани в зависимости от требований «внешнего механического поля», что показано в моделях in vivo. Показано, что механическая

стимуляция вызывает увеличение продукции остеоиндуцирующих факторов роста – BMP-2 и IGF-1, активирует транскрипцию ключевых транскрипционных факторов остеогенеза – Runx2 и Smad5, стимулирует транскрипцию и последующую белковую продукцию основных маркеров костной ткани (щелочной фосфатазы – ЩФ, коллагена I типа, остеокальцина, остеонектина, остеопонтина), способствует возрастанию уровня минерализации внеклеточного матрикса в культурах остеогенных клеток-предшественников [34-36], хотя эффекты не всегда однозначны в отношении различных популяций костных клеток.

Изучение гистологических срезов костей животных после космического полета показало, что в условиях микрогравитации преобладают менее зрелые клетки остеобластического фенотипа по сравнению с более дифференцированными формами, что указывает на то, что микрогравитация может блокировать определенные этапы развития и дифференцировки остеобластов [31]. Таким образом, постепенно становится все более очевидным, что эксперименты, выполненные в условиях микрогравитации на различных типах костных клеток (нормальных или трансформированных линиях остеобластов), являются важным шагом на пути понимания клеточных механизмов, опосредующих эффекты влияния микрогравитации на костную систему. Исходя из этого, в последние несколько лет предпринимаются многочисленные попытки оценки морфофункционального состояния, экспрессии стрессорных, активационных и других генов, а также различных показателей, отражающих дифференцировочный статус клеток, при их экспозиции в условиях реальной или моделированной микрогравитации.

В экспериментах, не всегда возможно воспроизвести и выявить все особенности влияния микрогравитации или гипокинезии на остеогенные клетки-предшественники костного мозга животных, и тем более человека. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в последние годы в области гравитационной биологии клетки, точные молекулярные механизмы гравитационной чувствительности МСК и более коммитированных остеогенных клеток-предшественников in vivo и in vitro еще предстоит установить. Всестороннее исследование биологии остеогенных клеток-предшественников тем более важно, что возрастной и медикаментозный остеопороз является большой медицинской и социальной проблемой современного общества, тогда как культивируемые МСК, представляют удобную модель для изучения всех этапов остеогенной дифференцировки, начиная со стадии самого раннего, наименее коммитированного предшественника. Таким образом, перед исследователями биологии МСК открываются широкие перспективы их дальнейшего использования с целью расширения сложившихся теоретических представлений о восприимчивости остеогенных клеток-предшественников к изменению параметров гравитационной среды, в том числе и в условиях реальной микрогравитации.

Основным условием поддержания здоровья и надежной профессиональной деятельности космонавтов является эффективная система медицинского обеспечения, включающая мониторинг состояния здоровья и использование средств профилактики для снижения и предотвращения неблагоприятного влияния на организм факторов КП и укрепление здоровья.

Наибольшее внимание уделяется профилактике негативных эффектов воздействия невесомости на различные системы организма и защиту от космических излучений.

В основу разработки и создания эффективной системы профилактики положены многолетние исследования, выполненные в КП и в наземных экспериментах по моделированию невесомости с использованием моделей гипокинезии и иммерсии. Используемые на МКС основные средства профилактики включают: бегущую дорожку, велоэргометр, нагрузочные костюмы, применение которых позволяет нагружать скелетно-мышечную и сердечно-сосудистую системы, активизировать проприорецепторы, сохранять позные и локомоторные функции; средства для предотвращения потери жидкости и минералов и поддержания ортостатической устойчивости при возвращении на Землю; использование сбалансированной диеты, витаминов и медикаментов. Анализ результатов применения средств профилактики на станции «Мир» и МКС выявил наличие корреляции между объемом применяемых средств профилактики и состоянием космонавтов после приземления. Одновременно ведутся исследования по разработке средств медицинского обеспечения и профилактики для будущих длительных орбитальных полетов и межпланетных экспедиций.

Разработка и совершенствование средств и методов медицинского обеспечения КП базировались на проведении фундаментальных физиологических исследований, которые показали, что целый ряд изменений в состоянии систем организма в космосе представляет значительный интерес для использования в здравоохранении. Основной объект исследований в космической физиологии – здоровый человек. В процессе отбора и подготовки космонавтов, во время КП и после их завершения накоплен большой объем научных данных, внесших значительный вклад в обоснование принципов профилактической медицины и нашедших широкое применение в клинике и при проведении массовых профилактических обследований населения.

Среди других космических технологий, широко применяющихся на Земле, следует отметить использование достижений космической телемедицины в клинической практике [2, 37]. Начиная с первых КП, медицинское обеспечение предусматривало получение физиологических данных и передачу их на Землю с помощью телеметрических систем динамического наблюдения и регистрации. По мере развития пилотируемой космонавтики увеличивалось число регистрируемых показателей и совершенствовалась их оперативная оценка медицинскими экспертами. Телемедицинские технологии отрабатывались в полетах разной продолжительности и способствовали обеспечению медицинской безопасности и космонавтов в полетах и после посадки на Землю.

При освоении дальнего космоса, наряду с необходимостью решения целого ряда сложных научных, технических и технологических проблем, человек столкнется с новыми экстремальными факторами, изучение которых позволит разработать новые элементы медицинского обеспечения и успешно работать в условиях космического пространства, в ближайшее время – на Луне и Марсе.

Список цитируемой литературы

1. Орбели Л.А. План научно-исследовательской работы по вопросу влияния стратосферных условий на организм человека и животных // Тезисы Всесоюз. конф. по изучению стратосферы. 1935. Л.; М. С. 585–590.

2. *Григорьев А.И., Орлов О.И., Потапов А.Н.* Роль отечественной космической медицины и физиологии в освоении космического пространства. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2023. №1, с. 5– 20.

3. *Корнилова Л.Н., Козловская И.Б.* Нейросенсорные механизмы синдрома космической адаптации // Физиология человека. 2003. Т. 29. № 5. С. 17–28.

4. *Григорьев А.И., Егоров А.Д.* Длительные космические полеты // Космическая биология и медицина / О.Г. Газенко, А.И. Григорьев, А.Е. Никогосян, С.Р. Молер, ред. М., 1997. Т. III. Кн. 2. Гл. 23. С. 368–447.

5. *Григорьев А.И., Попова И.А., Капланский А.С.* Минимализация функций регуляторных систем и обмена веществ в невесомости // Авиакосм. и экол. мед. 1993. Т. 27. № 5–6. С. 4–12.

6. *Газенко О.Г., Григорьев А.И., Наточин Ю.В.* Водно-солевой гомеостаз и космический полет // Проблемы космической биологии / А.М. Уголев, В.Л. Свидерский, ред. М., 1986. Т. 54.

7. *Григорьев А.И., Хантун К.,Моруков Б.В., Лейн Х., Ларина И.М., Смит С.* Исследование взаимодействия эндокринной, почечной систем в поддержании объемного и электролитного гомеостаза в условиях микрогравитации // В кн. Орбитальная станция «Мир». Медико-биологические эксперименты, М.2002. т.2, с. 137–158.

8. *Leach-Huntoon C., Grigoriev A.I.,* Natochin Yu.V., 1998.

9. Годичная антиортостатическая гипокинезия (АНОГ) – физиологическая модель межпланетного космического полета // *А.И. Григорьев, И.Б. Козловская, ред.* М., 2018.

10. *Ничипорук И.А., Моруков Б.В.* Исследование биохимических показателей в ходе длительных космических полетов на Международной космической станции // Международная космическая станция. Российский сегмент Т.2 Космическая биология и медицина. Россия. Москва. 2011. С. 228–234.

11. *Носков В.Б., Ничипорук И.А.* Неинвазивное определение жидкостных секторов организма человека в условиях космичекого полета (эксперимент «Спрут»)// Международная космическая станция. Российский сегмент Т. 2. Космическая биология и медицина. Россия. Москва. 2011. С. 235–248.

12. *Носков В.Б.* Водно-солевой гомеостаз и система гормональной волюморегуляции при космических полетах на орбитальной станции «Мир» // В кн. Орбитальная станция «Мир». Медико-биологические эксперименты, М.2002. т.2, с.121–136.

11. *Оганов В.С.* Возможные механизмы развития остеопении при гипокинезии. // Остеопороз и остеопатии. 1998. №2. С. 7–9.

12. *Оганов В.С.* Костная система, невесомость и остеопороз. Воронеж, 2014.

13. *Ничипорук И.А., Моруков Б.В.* Исследование биохимических показателей в ходе длительных полетов на международной космической станции // В кн. Международная космическая станция. Российский сегмент. Т. 2 М. 2011. с. 228–234.

14. *Burger E.H., Klein-Nulend J.* Microgravity and bone cell mechanosensitivity // Bone. Vol. 22. №5 (Suppl). P. 127S – 130S. 1998.

15. *Buravkova L.B., Gershovich P.M., Gershovich Yu.G., Grigoriev A.I.* Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic progenitor cells // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 1. P. 30–39.

16. *Sato A., Hamazaki T., Oomura T. et al.* Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells // Adv. Space Res. Vol. 24. №6. P. 807–813. 1999.

17. *Kumei Y., Shimokawa H., Ohya K. et al.* Small GTPase Ras and Rho expression in rat osteoblasts during spaceflight // Ann. N. Y. Acad. Sci.Vol. 1095. P. 292–299. 2007.

18. *Narayanan R., Smith C.L., Weigel N.L.* Vector-averaged gravity-induced changes in cell signaling and vitamin D receptor activity in MG-63 cells are reversed by a 1,25-(OH)2D3 analog, EB1089 // Bone. – 2002. – Vol. 31. – №3. – P. 381–388.

19. *Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б.* Морфофункциональное состояние и остеогенный дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток-предшественников человека при моделировании эффектов микрогравитации in vitro / Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №4. – С.196–202.

20. *Buravkova L.B., Romanov Yu.A.* / The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity // Acta Astronautica. 48:647–650, 2001.

21. *Carmeliet G., Nys G., Bouillon R.* Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells // J. Bone Miner. Res. – 1997. – Vol. 12. – №5. – P. 786–794.

21. *Hughes-Fulford M., Rodenacker K., Jütting U.* Reduction of anabolic signals and alteration of osteoblast nuclear morphology in microgravity // J. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 99. – №2. – P. 435–449.

22. *Kumei Y., Morita S., Katano H. et al.* Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts: osteopontin, CD44, osteonectin, and alpha-tubulin // Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 1090. P. 311–317. 2006.

23. *Hughes-Fulford M.* Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology // Cell biology and biotechnology in space edited by A. Cogoli. Advances in space biology and medicine. Vol. 8. P. 129–57. 2002

24. *Lewis M.L., Cubano L.A., Zhao B. et al.* cDNA microarray reveals altered cytoskeletal gene expression in space-flown leukemic lymphocytes (Jurkat). // FASEB J. 2001. Vol. 12. № 11. P. 1007–1018.

25. *Yuge L., Hide I., Kumagai T. et al.* Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. Vol. 39. №1-2. P. 89–97. 2003.

26. *Yuge L., Kajiume T., Tahara H. et al.* Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation // Stem Cells Dev. Vol. 15. №6. P. 921–929. 2006.

27. *Dai Z.Q., Wang R., Ling S.K. et al.* Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells // Cell Prolif. – 2007. – Vol. 40.–№5. – P. 671–684.

28. *Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R. et al.* Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Cell Biochem. – 2004. – Vol. 93. – №4. – P. 697–707.

29. *Huang Y., Dai Z.Q., Ling S.K.* Gravity, a regulation factor in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. // J. Biomed. Sci. 2009. Vol. 16. №87 – electronic publication.

30. *Kawashima K., Yamaguchi A., Shinki T. et al.* Microgravity generated by space flight has little effect on the growth and development of chick embryonic bone // Biol. Sci. Space. Vol. 9. №2. P. 82–94. 1995.

31. *Marie P.J., Jones D., Vico L. et al.* Osteobiology, strain, and microgravity: part I. Studies at the cellular level // Calcif. Tissue Int. Vol. 67. №1. P. 2–9. 2000.

32. *Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R. et al.* Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // J. Cell Biochem. Vol. 93. №4. P. 697–707. 2004.

33. *Meyers V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T.,* McDonald J.M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human

mesenchymal stem cells in modeled microgravity // J. Bone Miner. Res. Vol. 20. №10. – P. 1858–1866. 2005.

34. *Vico L., Hinsenkamp M., Jones D. et al.* Osteobiology, strain, and microgravity. Part II: studies at the tissue level // Calcif .Tissue Int. Vol. 68. №1. P. 1–10. 2001.

35. *Zhivodernikov I., Ratushnyy A., Buravkova L.* Simulated microgravity remodels extracellular matrix of osteocommitted mesenchymal stromal cells. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11), 5428.

36. *Buravkova L., Larina I., Andreeva E., Grigoriev A.* Microgravity Effects on the Matrisome Cells. 2021; 10(9):2226.

37. *Григорьев А.И., Орлов О.И., Логинов В.А. и др.* Клиническая телемедицина. М., 2001.

ВООРУЖЕННЫЙ КОНФЛИКТ КАК ЭКСТРЕМАЛЬНАЯ СИТУАЦИЯ

Ю.А. Бубеев

Понятие «экстремальные факторы» и «экстремальные ситуации» утвердилось в научной литературе в годы Второй мировой войны как результат естественного стремления представителей научной медицины выделить разрушительные факторы военного времени в особую категорию факторов [Китаев-Смык 2013]. Наиболее экстремальным среди всего спектра возможных воздействий, которым подвергается современный человек, является комплекс факторов участия в боевых действиях, а участники боевых действий находятся в группе наиболее высокого риска по развитию расстройств здоровья. Борьба между воинским долгом и инстинктом самосохранения порождает мощный внутриличностный конфликт, способный привести к боевой психической травме и утрате дееспособности.

Экстремальная ситуация всегда отражает угрозу и первоначально адресуется психике. Сила и продолжительность ее воздействия отражается состоянием сознания. Поэтому экстремальная ситуация может быть одной для многих, а формы ее отражения в сознании конкретного комбатанта могут быть разными. Это объясняется тем, что человек может реагировать не на сам факт угрозы жизни, а на ее воображаемые последствия.

Боевой стресс, вызываемый стресс-факторами боя, позволяет мгновенно мобилизовать имеющиеся у военнослужащего ресурсы выживания, сохранения боеспособности, преодоления предельных физических и психологических нагрузок. Однако, когда боевые стресс-факторы по своей силе превосходят возможности стресс-реактивных механизмов, организм военнослужащего отвечает на эту ситуацию травматическим стрессом, закрепляющимся в боевой психической травме. Как стрессогенный феномен боевая психическая травма наступает внезапно и неожиданно, создает угрозу жизни и психофизической целостности организма и личности, так как находится вне пределов нормального обыденного жизненного опыта [Караяни А.Г. 2022].

В работе «Начала военно-полевой медицины» Н.И. Пирогов определяет современную ему войну как травматическую эпидемию. Характеризуя войны XXI века, следует, видимо, дополнить это определение и «психотравматической эпидемией», учитывая структуру боевых санитарных потерь. В зависимости от конкретных условий, а также индивидуального уровня нервно-психической устойчивости риск развития сопутствующих психических расстройств может достигать 85 % [Литвинцев С.В., Снедков Е.В., Резник А.М. 2005]. Указанные нарушения, как правило, сопровождаются выраженными тревожно-депрессивными состояниями (60-68 % случаев), патологически усиленными формами негативных эмоциональных реакций (до 80 % случаев), «конверсивными» расстройствами (около 20 % случаев), диссоциативными состояниями (10-15 % случаев).

Наиболее яркие проявления нарушений на личностном, психофизиологическом, эмоционально-вегетативном и соматическом уровне преобладают именно в первые дни и недели после психотравмирующих событий, тогда как отсроченные формы стресс-индуцированных расстройств формируются спустя 2-3 года и характеризуются тяжелыми проявлениями социально-психологической дезадаптации [Цыган В.К. 2014].

Интенсивность переживания боевого стресса зависит от взаимодействия двух основных факторов – силы и длительности воздействия на психику военнослужащего боевых стрессоров и особенностей реагирования военнослужащего на их воздействие [Шамрей. 2015].

Различные боевые стрессоры подразделяются на специфические и неспецифические для боевой обстановки [Евдокимов. 2018].

Первые обладают повышенным уровнем стрессогенности и включают:

- ситуации, угрожающие жизни и здоровью военнослужащего;
- ранения, контузии, увечья и дозы облучения;
- гибель близких людей и сослуживцев;
- ужасающие картины смерти и человеческих мучений;
- случаи гибели сослуживцев, мирных граждан, ответственность за которые военнослужащий приписывает себе;
- события, в результате которых пострадали честь и достоинство военнослужащего.
- Ко второй группе относятся стрессоры, присущие как боевой обстановке, так и другим видам стрессовых ситуаций:
- повышенный уровень перманентной угрозы для жизни;
- длительная напряженная деятельность;
- длительная неудовлетворенность основных биологических и социальных потребностей;
- резкие и неожиданные изменения условий службы и жизнедеятельности;
- тяжелые экологические условия жизнедеятельности;
- отсутствие контактов с близкими;
- невозможность изменить условия своего существования;
- интенсивные и длительные межличностные конфликты;
- повышенная ответственность за свои действия;
- возможность погибнуть, получить ранения или попасть в плен.

Реакция военнослужащего на воздействие стрессоров боевой обстановки зависит как от их значимости для конкретного участника боевых действий, так и от особенностей его совладающего поведения. Значимость воздействия на психику военнослужащего боевых стрессоров определяется его индивидуально-психологическими особенностями и личностными свойствами, психологической и профессиональной готовностью к ведению боевых действий, характером и уровнем боевой мотивации, особенностями восприятия военнослужащим места и роли боевых действий в истории и перспективе его системы жизнедеятельности [Китаев-Смык Л.А. 2001].

Диагностика и коррекция негативных последствий, возникающих в результате воздействия комплекса факторов участия в боевых действиях, относится к числу наиболее актуальных проблем клинической физиологии

и медицины. Кроме военно-прикладного аспекта проблемы, весьма значимым является и социально-гуманистический аспект, касающийся физического и психического здоровья военнослужащих после возвращения к мирной жизни. Как показал опыт войн последних десятилетий, важнейшей особенностью военных конфликтов является то, что с прекращением воздействия их факторов, нормализации функционального состояния сразу не наступает. «Шлейф» различных психических и психосоматических расстройств тянется еще достаточно долго, а иногда и в течение всей жизни человека, т. е. развивается синдром посттравматических стрессовых расстройств [Караваева Т.А., Васильева А.В. 2022, Козлов, Бубеев 2022, Duncan LE, Cooper BN, Shen H. 2018].

Наиболее распространенные типы отрицательного реагирования в условиях боя у большинства военнослужащих – реакции страха и тревоги. Это прежде всего сказывается на функциях мышления и памяти, стирает навыки обращения с техникой. Однако следует отметить, что закономерности развития психологических и психофизиологических особенностей деятельности человека в бою не имеют линейной зависимости, чрезвычайно сложны, что обусловлено как чрезмерностью воздействующих условий боевой обстановки, так и многокомпонентностью структуры личности [Решетников М.М. 2018].

Специфика травматичного опыта, с одной стороны, включает в себя трудности с припоминанием истинной последовательности событий, а с другой – характеризуется неконтролируемыми наплывами воспоминаний. В целом, травматичный опыт имеет следующие особенности: (1) он состоит не из мыслей, а из сенсорных составляющих (образы, звуки, ощущения, реже вкус и запах); (2) воспоминания переживаются не как воспоминания, а как нечто, что происходит с человеком «здесь и сейчас»; (3) запечатленные сенсорные составляющие и связанные с ними эмоции переживаются вновь и вновь как истинные, даже если человек узнал информацию, опровергающую его представления о случившемся; (4) возможно переживание аффекта без соответствующих воспоминаний, когда, например, жертва боевых действий испытывает тревогу при пролетающем у него над головой гражданским самолетом и (5) переживание травматичного опыта могут быть запущены большим количеством различных стимулов и ситуаций, зачастую кажущихся весьма безобидными (например, запах сирени или какая-то ключевая фраза) [Кадыров, 2020].

В соответствии с современными представлениями, ключевым механизмом развития посттравматического стрессового расстройства является процесс формирования прочной аффективной связи между пережитыми в прошлом психотравмирующими событиями и постоянно возобновляющимися ситуациями, напоминающими об этом [Казенная Е.В. 2020, Цыган В.К. 2014]. Реализация данного механизма осуществляется за счет двух взаимосвязанных явлений:

- консолидации памяти, под которой понимается процесс перехода кратковременной памяти в долгосрочное изменение за счет химических и структурных образований в соответствующих нервных окончаниях;
- реконсолидации памяти как активного процесса восстановления и стабилизации первоначального следа активированной памяти.

Механизмы консолидации и реконсолидации памяти в настоящее время являются предметом интенсивных исследований, поскольку их понимание не только позволяет раскрыть базовые принципы функционирования долговременной памяти у человека, но и открывает перспективы лечения обширного перечня психических расстройств, характеризующихся непроизвольными рецидивирующими воспоминаниями [Зюзина А.Б., Балабан П.М. 2015, Meloni E.G. 2014, Lee J.L.C., Nader K., Schiller D 2017].

Представляется весьма значимым положение ряда исследователей, считающих, что выраженность стресса является относительной величиной и определяется отношением к нему самого субъекта. Стресс является реакцией не столько на физические свойства ситуации, сколько на особенности взаимодействия между личностью и окружающим миром. Это в большей степени продукт когнитивных процессов, образа мыслей и оценки ситуации, знания собственных ресурсов, степени обученности способам управления и стратегии поведения, их адекватному выбору. Поэтому условия возникновения и характер проявления стресса (дистресса) различны у различных участников боевых действий [Китаев-Смык Л.А. 2001].

Боевая стрессовая реакция – общий термин, который охватывает все возможные реакции на боевые условия. Эта реакция может иметь как положительный, приспособительный эффект, воодушевив воина на акты героизма, так и отрицательный, сделав его недееспособным.

Таким образом, континуум состояний, с которыми сталкивается медицина в период ведения боевых действий, включает боевую стрессовую реакцию (наиболее легкое проявление дезадаптационных расстройств), боевое утомление и посттравматическое стрессовое расстройство, а также реактивные состояния как наиболее тяжелые формы боевой психиатрической патологии [Евдокимов В.И., Рыбников В.Ю., Шамрей В.К. 2018].

Для разработки эффективных мер профилактики и коррекции дезадаптационных нарушений важна не столько феноменология, как обязательная расшифровка конкретных механизмов осуществления приспособительных реакций от стимула до тех звеньев в процессах регуляции, которые обеспечивают изменение адаптивного поведения [Новиков В.С., Сороко С.И. 2017].

Однако, несмотря на богатую историю, проблема боевых стрессовых расстройств до настоящего времени не может быть отнесена к всесторонне изученным. Причины этого заключаются как в трудности организации исследований подобного рода в реальных боевых условиях, так и в отсутствии адекватных методов оценки. Недостаточность теоретической разработки проблемы боевого стресса, неясность механизмов развития, неочерченность границ нарушений, отсутствие четких диагностических и прогностических критериев создают значительные трудности для медико-психологического обеспечения вооруженных конфликтов.

Как показали результаты наших исследований, проведенных непосредственно в боевых условиях, воздействие комплекса факторов боевой обстановки сопровождается выраженными изменениями на личностном, психофизиологическом, эмоционально-вегетативном и соматическом уровнях [Ушаков И.Б., Бубеев Ю.А 2004]. Результаты мониторирования ЭКГ в наиболее критичные моменты боя показали крайне высокий, не встречающийся

в других условиях уровень симпатоадреналовой активности. Если воздействие, связанное с реальной угрозой для жизни, продолжается достаточно долго, наблюдаются признаки исчерпания резервов симпатической регуляции и развитие своеобразной «симпатической недостаточности».

Система кровообращения, как известно, является универсальным индикатором функционального состояния организма и уровня стресса. Проведенное нами исследование параметров системной гемодинамики показало, что уже в первую неделю участия в боевых действиях наблюдался устойчивый симптомокомплекс, проявляющийся повышением системного артериального давления, увеличением общего периферического сопротивления и минутного объема циркуляции, что является характерным для выраженной симпатикотонической реакции, хронического переутомления и свидетельствует о снижении резервных возможностей системы кровообращения. Установлено, что в боевых условиях почти у половины комбатантов наблюдалось значимое несоответствие между объемом крови, поступающей в артериальное русло, и его емкостью, которое у каждого четвертого составляло более 20%. Относительное повышение артериального давления сопровождалось и достоверным увеличением периферического сопротивления, что указывает на нарастающий спазм периферических сосудов, а реакция кровообращения в целом носит явно гипертензивный характер.

У военнослужащих с высокой степенью реактивности к психоэмоциональному стрессу в послебоевом периоде наблюдались крайне высокие значения параметров гемодинамики, не встречающиеся у здоровых людей (системное артериальное давление более 120 мм. рт. ст., общее периферическое сопротивление – более 2200 дин*см^5*сек). Это свидетельствует о выраженном истощении резервных возможностей механизмов регуляции и снижении функциональной надежности. Сравнение этих данных с результатами исследований других групп комбатантов, сопоставимых по возрасту и антропометрическим данным и не участвующих в боевых действиях, выявило выраженные отличия и не было характерно даже для выполнения наиболее сложных видов боевой подготовки.

Одной из основных проблем, с которыми сталкиваются практически все военнослужащие в боевой обстановке, является нарушение ночного сна. Нарушение засыпания, частые пробуждения, навязчивые ночные кошмары, разбитость утром характерны практически для всех в боевых условиях. Эти сигналы внутреннего неблагополучия еще более затрудняют процессы восстановления после тяжелых боевых нагрузок. Установлено, что доля быстрого сна возрастает после эмоциональных переживаний предшествующего дня и является как бы «клапаном» для снятия последствий боевого стресса. В боевых условиях происходят грубые нарушения структуры сна. Замедляется засыпание. Количество ночных пробуждений увеличивается до нескольких десятков раз. Утром характерно пробуждение в фазе медленного сна, что приводит к чувству разбитости, дезориентированности, сопровождается резкой тахикардией.

Результаты исследования функционального состояния и работоспособности у военнослужащих, находящихся в зоне боевых действий в течение одного и более месяцев, показали нарастание признаков повышения активности структур головного мозга на фоне истощения его резервов, выраженные

признаки астенизации, утомления, угнетения психической сферы, значимое снижение надежности деятельности при крайне высоких значениях ее физиологической цены, причем заметное увеличение индекса межполушарной асимметрии говорит об ухудшении функционального состояния и более глубоких структур головного мозга.

Первым и наиболее значимым аспектом, привлекшим внимание врачей к проблеме боевого стресса, были изменения в психике. Трудно объяснимый и не укладывающийся в рамки общепринятых представлений характер воздействия боевого стресса, его последствия, практически неотвратимый характер их возникновения, неопределенная отсроченность – все это дало возможность ряду авторов сделать предположение о ведущей роли изменений в подсознательной сфере [Казенная Е.В. 2020, Шамрей В.К. 2015]. Наиболее распространенные типы отрицательного реагирования в условиях боя – неосознаваемые реакции страха и тревоги. Значимость этой проблематики определяется и тем, что тревога и страх на подсознательном уровне лежат в основе подавляющего большинства психических нарушений – невротических, депрессивных, психосоматических расстройств, суицидов, алкогольных и наркотических зависимостей [Решетников М.М. 2018].

Изучение неосознаваемых механизмов, связанных с проявлениями страха и тревоги, – весьма актуальная задача. Депрессии, посттравматические расстройства, другие формы психической дезадаптации – все это следствия экстремальных кратковременных или длительно действующих травматических ситуаций, с которыми все больше приходится сталкиваться современному человеку. В современной психофизиологии общепринятым является представление о том, что психика является наиболее совершенным и в тоже время наиболее ранимым аппаратом приспособления человека к среде, и особенно в ситуации жизнеугрожающего стресса, этот вид адаптации может нарушаться в первую очередь [Караваева Т.А., Васильева А.В.2022].

Однако многие методы изучения бессознательного весьма субъективны, и получаемые с их помощью результаты в существенной, если не определяющей, степени зависят как от уровня квалификации специалиста, так и от теоретических позиций, на которых этот специалист основывается. В рамках психофизиологического подхода, когнитивной психофизиологии бессознательное рассматривается не как самостоятельная психическая реальность, противостоящая сознанию, а как некие нижележащие уровни сознания, характеризующиеся меньшей расчлененностью и рефлексивностью [Петренко В.Ф. 2010].

В настоящее время накоплено достаточно много данных о том, что содержание стимулов, предъявляемых на подпороговом уровне, находит свое отражение в различных показателях вызванной активности мозга.

С этой точки зрения актуальным является вопрос о возможности использования психофизиологических методов для анализа неосознаваемых явлений в контексте решения практических психодиагностических задач. Исследования, проведенные Э.А. Костандовым (1977, 1997) и другими авторами (Бетелева, 1996), позволяют говорить о правомерности такого рода постановки вопроса.

В этих работах убедительно доказан факт наличия различий поздних компонентов ВП при предъявлении нейтральных и эмоционально значимых слов на уровне ниже порога осознания и показано, что возможно формирование

на неосознаваемом уровне временных связей, при этом сила и устойчивость образующейся связи зависят от эмоциональной значимости подкрепляющего слова и его соответствия доминирующей мотивации.

Нами использовался психодиагностический метод, основанный на анализе вызванных ЭЭГ-реакций на предъявление семантической информации, позволяет оценить влияние на человека различных психологических факторов, в том числе способствующих развитию стрессовых расстройств и других видов дезадаптации [Квасовец С.В., Иванов А.И., Бубеев Ю.А. 2002]. Метод основан на технологии анализа реакций мозга в ответ на предъявление стимулов (слов, изображений) различного психологического содержания («нейросемантическая психодиагностика») при предъявлении вербальных стимулов ниже порога осознания.

В качестве стимульного материала использовались слова, относящиеся: во-первых, к различным сферам жизни (группы семья, деньги и др.); во-вторых, к личностным детерминантам, участвующим в формировании структуры неосознаваемых установок (самооценка, отношение к смерти, отношение к сексу и др.); в-третьих, информация, специфичная для людей, участвующих в военных действиях (группы война, плен, ранение, приказ, враг и др.).

Анализ результатов обследования бойцов спецназа, у которых клинические признаки посттравматических стрессовых расстройств выражены в наибольшей степени (рис.1), показал, что для них характерна резко выраженная акцентуация реакции на стимул «страх», чего не наблюдается у других групп военнослужащих (рис. 2).

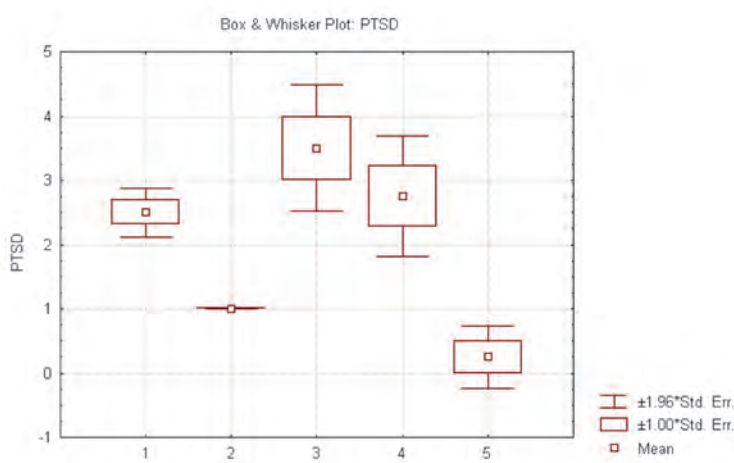

Рис. 1. Ось абсцисс – группы: 1 – летчики, имеющие большой опыт боевых вылетов; 2 – летчики, не имеющие боевого опыта; 3 – спецназ; 4 – офицеры с боевым опытом; 5 – технический персонал
Ось ординат – выраженность признаков посттравматического стрессового расстройства в баллах по пятибалльной шкале.

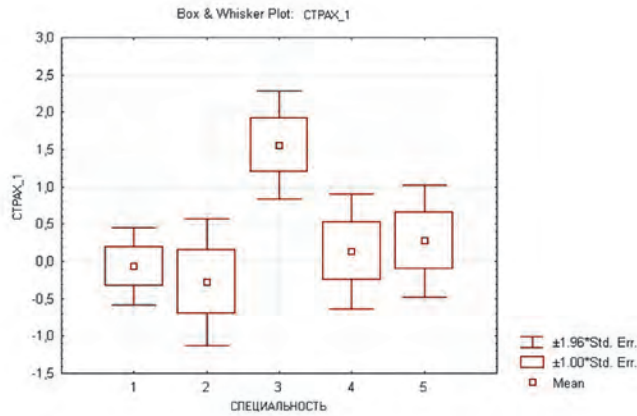

Рис.2. Ось абсцисс – группы: 1 – летчики, имеющие большой опыт боевых вылетов; 2 – летчики, не имеющие боевого опыта; 3 – спецназ; 4 – офицеры с боевым опытом; 5 – технический персонал
Ось ординат – числовые значения показателя.

В то же время, проблематика, относящаяся к другим жизненным сферам, связанным с военными действиями («плен», «ранение», «приказ»), с мирной жизнью («семья»), с социальными отношениями («друг») подвергается психологической защите. Эта защита может служить способом адаптации к стрессорным условиям, но с другой стороны – такого рода реагирование может быть основой формирования клинической симптоматики, характерной для посттравматических стрессовых расстройств – снижения интереса к ранее значимой деятельности и отношениям, чувства отстраненности или отдаленности от других людей.

У всех летчиков стимулы, означающие угрозу смерти, опасность полетов и т. д., воспринимаются как угрожающие на самых ранних этапах семантической переработки при малом времени предъявления стимула, когда затрагивается целостность базовых структур субъективного опыта, связанных с самосохранением (табл. 1).

Таблица 1. Особенности реагирования на подпороговую стимуляцию летчиков, имеющих невротическую симптоматику.

СТИМУЛ	*parameters*	*group 1*	*group 2*	*t*	*p*
СМЕРТЬ	F3_T1	-0,444	0,542	-2,651	0,019
СМЕРТЬ	F4_T1	-0,459	0,546	-2,659	0,018
СТРАХ	F4_T1	-0,344	0,475	-2,602	0,020
ГИБЕЛЬ	T4_T1	-0,489	0,547	-2,194	0,045
КАТАПУЛЬТА	F4_T1	-0,331	0,833	-2,461	0,027
КАТАПУЛЬТА	T4_T1	-0,316	0,824	-2,353	0,033
ПОЛЕТ	T4_T1	-0,629	0,425	-2,888	0,011
СМЕРТЬ	F3_T2	-0,511	0,864	-2,863	0,012

T1 - время экспозиции 30 мсек
T2 - время экспозиции 50 мсек

Группа 1 - летчики, не имеющие невротической симптоматики
Группа2 - летчики, имеющие невротическую симптоматику

Однако на социальном уровне обнаружены существенные отличия. У асов – наиболее опытных летчиков-испытателей – эта угроза, так или иначе, компенсируется, вытесняется. Это, по-видимому, является одним из условий воспитания летного профессионализма и одним из механизмов формирования психологической устойчивости, чего не наблюдается при утрате летных навыков и малом налете. Наоборот, здесь отмечается выраженная акцентуация, и это становится фактором, способным дезорганизовать поведение.

Установлено, что ядерным структурам субъективного опыта соответствует не только угроза собственной жизни, но и угроза самооценке – т. е. базовым личностным образованиям. Так, по результатам анализа данных обследования комбатантов с тревожно-фобическими расстройствами, страхом смерти, реакции как на стимулы «смерть», «страх», так и на стимулы, означающие угрозу самооценке, достоверно различались именно на уровне базовых личностных структур.

Таким образом, изменения в подсознательной сфере при боевом стрессе имеют самый глубинный характер и затрагивают базовые эго-структуры.

Так как психическая сфера выступает регулятором многих функций организма, в том числе на физиологическом и биологическом уровнях, то изменения в ней могут сказываться на функционировании других систем и органов, которые в данном случае могут рассматриваться как психофизиологические, эмоционально-вегетативные и физиологические корреляты.

Знание психофизиологических механизмов возникновения расстройств здоровья при действии факторов боевой обстановки будут полезными для алгоритмов выявления уязвимых лиц, критериев отбора наиболее устойчивых контингентов, прогнозирования траекторий развития патологии, персонифицированной коррекции. Это может сделать боевые стрессовые расстройства теоретически предотвратимыми медицинскими последствиями войны.

Список литературы

1. *Бетелева Т.Г.* Возрастные особенности непроизвольного восприятия зрительных стимулов. /Физиология человека. 1996. Т.22. №5. С.75–84

2. *Евдокимов В.И., Рыбников В.Ю., Шамрей В.К.* Боевой стресс: наукометрический анализ отечественных публикаций (2005–2017 гг.) : науч. изд. / Всерос. центр экстрен. и радиац. медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Воен.-мед. акад. им. С.М. Кирова, С.-Петерб. гос. ун-т. СПб. : Политехника-принт, 2018. 170 с.

3. *Зюзина А.Б., Балабан П.М.* Угашение и реконсолидация памяти // Журнал высшей нервной деятельности. 2015. Т. 65. №5. С. 564–576.

4. *Кадыров Р.В.* Посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD): состояние проблемы, психодиагностика и психологическая помощь. – М.: Издательство Юрайт, 2020. – 644 с.

5. *Казенная Е.В.* Современные зарубежные исследования посттравматического стрессового расстройства и его лечения эффективными психотерапевтическими методами у взрослых // Современная зарубежная психология. 2020. Том 9. №4. С. 110–119.

6. *Караваева Т.А., Васильева А.В.* Реакции на тяжелый стресс и нарушения адаптации в кн. «Тактика врача-психиатра: практическое руководство / под ред. Н.Г. Незнанова, Г.Э. Мазо. – Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2022. – С. 127–135.

7. *Караяни, А.Г.* Психология боевого стресса и стресс-менеджмента: учебное пособие для вузов /А.Г. Караяни. – 2-е изд. – Москва : Издательство Юрайт, 2022. – 145 с.

8. *Квасовец С.В., Иванов А.И., Бубеев Ю.А.* Анализ подпорогового восприятия вербальных стимулов как инструмент психодиагностического исследования // Психологический журнал, 2002. № 3, С. 45-54.

9. *Китаев-Смык Л.А.* Психология стресса / Л.А. Китаев-Смык – М.: 2013. – 368 с.

10. *Китаев-Смык Л.А.* Стресс войны: Фронтовые наблюдения врача-психолога. – М.: Российский институт культурологии, 2001. – 80с.

11. *Козлов В.В., Бубеев Ю.А., Власов Н.А.* Психология и феноменология посттравматического стрессового расстройства. М., 2022 – 243 с.

12. *Костандов Э.А.* Восприятие и эмоции. М. Медицина. 1977. С. 247

13. *Костандов Э.А.* Психофизиология бессознательного. // Основы психофизиологии. Ред Александров Ю.И. М., Инфра-М, 1997, с. 220–243.

14. *Новиков В.С., Сороко С.И.* Физиологические основы жизнедеятельности человека в экстремальных условиях / В.С. Новиков, С.И. Сороко. – СПб: Политехника-принт, 2017. – 476 с.

15. *Петренко В.Ф.* Многомерное сознание: психосемантическая парадигма. — М.: Новый хронограф, 2010. – 440 с., ил.,

16. *Решетников М.М.* Психическая травма. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 201 с.

17. *Ушаков И.Б., Бубеев Ю.А.* Влияние факторов участия в локальном вооруженном конфликте на здоровье военнослужащих «Война или здоровье?» Составитель И. Тайпале. Предисловие Кофи Аннана. Пер. с англ. Архангельск, 2004, с. 356 – 361.

18. *Цыган В.К* Нейрофизиологические механизмы боевых постэкстремальных состояний // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т 100, № 10. С. 1220–1235

19. *Шамрей В.К.* Психиатрия войн и катастроф. Учебное пособие Издательство «СпецЛит», 2015, 453с

20. *Duncan LE, Cooper BN, Shen H.* Robust Findings From 25 Years of PTSD Genetics Research. Curr Psychiatry Rep. 2018 Oct 23;20 (12):115. doi: 10.1007/s11920-018-0980-1. Erratum in: Curr Psychiatry Rep. 2018 Nov 26; 20(12):119. Title corrected. PMID: 30350223; PMCID: PMC6209025

21. *Lee J.L.C., Nader K., Schiller D.* An Update on Memory Reconsolidation Updating // Trendsin Cognitive Sciences. 2017. V. 21. № 7. P. 531–545.

22. *Meloni E.G., Gillis T.E., Manoukian J., Kaufman M.J.* Xenon Impairs Reconsolidation of Fear Memories in a Rat Model of Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) // PLoS One. 2014. Vol. 9, N 8. Art. e106189. DOI: 10.1371/ journal.pone.0106189.

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ С ПОЗИЦИЙ СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА

А.В. Алехнович

Проблема приспособления организма к воздействию экстремальных факторов окружающей среды и возможность коррекции адаптационных процессов является и, вероятно, еще долго будет оставаться одним из наиболее значимых для клинической физиологии вопросов. Результаты фундаментальных исследований в области изучения компенсаторных механизмов при воздействии внешних экстремальных факторов позволят перейти к решению важных практических задач клинической и профилактической медицины, конечной целью которых, безусловно, является продление активного, здорового долголетия человека, снижение исчерпанной заболеваемости населения и его смертности вследствие воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды.

Общая теория адаптации сложных биологических систем основана к настоящему времени на феноменах постоянства внутренней среды К. Бернара, гомеостазиса У. Кеннона, стресса и его динамических проявлений во времени Г. Селье, парадигмы функциональных систем, их формирования и взаимодействия по П.К. Анохину. Несмотря на то что рассматриваемые феномены были подробно описаны физиологами более 30-60 лет назад, следует признать, что до настоящего времени достижения в области фундаментальных исследований не нашли должного отражения в прикладном аспекте и в полной мере не внедрены в работу практического звена здравоохранения, в том числе при оказании специализированной медицинской помощи при экстремальных состояниях, вызванных, в том числе, воздействием химического фактора [1, 2, 10, 11, 26].

Во многом это может быть объяснено сложностью понимания для клинициста основных положений теории адаптации. Как заметил И.П. Павлов, понятая правильно идея о приспособлении или целесообразности представляет собой неисчерпаемый источник для различных научных гипотез, служит постоянной научной темой, дает могучий толчок к дальнейшему изучению вопросов о сущности жизненных явлений [10, 11].

В клинических исследованиях вопросам физиологии, и в частности проблеме адаптации к развитию патологического процесса, как правило, не уделяется должного внимания. Вопрос рассматривается с позиций исследования изолированной реакции одной, двух, трех систем: кардиореспираторная, нейроэндокринноиммунная, показатели крови и их детальное изучение. Вместе с тем раскрытие основных закономерностей формирования реакций и развития процессов в организме под влиянием внешнего стресс-фактора невозможно без системного подхода, на что указывал еще академик АМН СССР П.К. Анохин (1972) [2, 28].

Характер развития химической болезни, которая занимает существенное место в структуре заболеваемости и летальности населения Российской Федерации, например вследствие отравлений алкоголем и его истинными и ложными суррогатами, кроме специфических свойств химического соединения, в значительной мере определяется индивидуальной реакцией организма, его устойчивостью к воздействию экстремального фактора, то есть неспецифическими адаптационными процессами [12-14]. По современным представлениям устойчивость является иерархически организованной системой и может рассматриваться на разных уровнях – гомеостатическом, морфофункциональном, нейродинамическом, психофизиологическом [21, 26]. Очевидна их тесная взаимосвязь – стратегия определяет выбор механизмов реализации функции, а имеющиеся возможности механизмов определяют выбор или отказ от одной и переход к другой стратегии. По мнению К.К. Ильяшенко (1997), подход к изучению химической болезни, основанный на рассмотрении только одной стороны ее многофакторного патогенеза, приведет к ложному направлению проводимых лечебных мероприятий [9].

Современное состояние развития клинической физиологии позволяет рассматривать неспецифические компенсаторные механизмы и приспособительные процессы на воздействие экстремальных факторов, в том числе химической этиологии, с позиций теории функциональных систем П.К. Анохина (1975) и его научной школы [2, 28].

«Под функциональной системой мы понимаем такую динамическую организацию процессов и механизмов, которая, отвечая запросам данного момента, обеспечивает организму какой-либо приспособительный эффект и вместе с тем определяет потоки обратной, т. е. результативной афферентации, информирующей центральную нервную систему о достаточности или недостаточности полученного приспособительного эффекта. Иначе говоря, любая функциональная система, врожденная или динамически складывающаяся в данной ситуации, непременно обладает чертами саморегуляции с характерными только для нее узловыми механизмами» [2].

Отношения различных функциональных систем в едином организме осуществляются на основе принципов доминирования, мультипараметрического и последовательного взаимодействия, системогенеза и системного квантования [28].

В исследованиях и описании с позиций системного анализа адаптационных процессов организма при острых отравлениях, которые следует рассматривать как химическую травму, существует объективная трудность, которая заключается в том, что невозможно изолировать определенную часть организма, отдельную его систему из целого. В методологическом плане Дагаев В.Н. и соавт. (2001) предлагают использовать для этих целей метод факторного анализа и последующее построение структурного портрета химической болезни (на основе методов многомерного статистического анализа данных, в частности – кластерный анализ) [1, 7]. Такой подход впервые широко использован в работах Ильяшенко К.К. (1993, 1997), которые выполнены в центре лечения острых отравлений научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (г. Москва) [9]. Визуализация полученной информации в виде многомерных графиков демонстрирует

сложность и иерархическую упорядоченность функциональных связей между различными системами организма – нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и др. При этом возможно исследовать два уровня регуляции: внутрисистемный (между элементами одной системы) и межсистемный. При таком подходе, помимо иерархических (вертикальных) связей, отражающих подчиненность элементов гомеостаза внутри одной системы, выявляется и горизонтальная иерархия, которая демонстрирует соподчиненность либо соучастие в процессе подсистем одного и того же уровня [7, 9].

Химическая травма вследствие воздействия психотропных веществ вызывает наибольший интерес по причине значительной распространенности среди населения Российской Федерации и социально-экономической опасности такого вида отравлений.

Изучение формирования функциональных систем и их взаимодействия при химической травме психотропными веществами, как отражение компенсаторно-приспособительных процессов, проводилось в период с 2005 по 2014 год на базе отделения токсикологии городской клинической больницы № 33 департамента здравоохранения г. Москвы и центра лечения острых отравлений научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (г. Москва) [1]. Были проанализированы результаты функциональных и клинико-лабораторных показателей у 674 пациентов с отравлениями легкой, средней и тяжелой степени. Острые отравления циклическими антидепрессантами составили 220 наблюдений, нейролептиками – 218 наблюдений, смесью психоактивных веществ – 236 наблюдений [1].

В ходе статистической обработки исходного материала широко применялись многомерные методы статистического анализа, основу которых составляет концепция теории систем. Согласно этой теории, система представляет собой объединение множества взаимосвязанных элементов, которые являются системой более высокого порядка. Сами элементы являются системами более низкого уровня. Элемент – часть системы, обладающая относительной самостоятельностью. Структура системы представляет собой множество ее существенных свойств и связей [1].

В таблице 1 представлено формирование функциональной системы, отражающей адаптационные реакции организма при отравлениях психотропными препаратами легкой степени. На незначительный уровень химического воздействия организм отвечает минимальным набором признаков.

Таблица 1. Функциональная система при отравлениях психотропными препаратами легкой степени (n=236)

№ п/п	Признак	Группы факторов		
		I	II	III
1	2	3	4	5
	СМП254 нм	0,63		
	МДА	0,46		
	Лейкоциты	0,55		
	Т-лимф.	0,86		

Продолжение таблицы 1.

	В-лимф.		0,41	
	Ig A		0,43	
	Ig G		0,42	
	Фп, 120		0,46	
	АФП, 30			0,67
	Иб,30			0,57
	Иб,120			0,54
	ЦПА			0,68

Признаки первого фактора указывают на активацию клеточного звена иммунной защиты и перекисного окисления липидов, что объективно отражает процессы естественной детоксикации, направленные на ускорение биотрансформации токсиканта. Появление в первой группе маркера эндотоксемии ($СМП_{254\ нм}$) свидетельствует, по нашему мнению, об усилении процессов катаболизма в условиях стресса химической этиологии. Значение детоксикационной функции иммунной системы подтверждает включение показателей гуморального звена иммунитета и неспецифической резистентности во второй и третий факторы. Сопоставление данных лабораторных исследований с клиническим течением заболевания указывает на состоятельность механизмов естественной детоксикации организма. Лечение на данном этапе заболевания, с учетом клинических наблюдений, не требует применения методов искусственной детоксикации. В целом, формирующаяся функциональная система демонстрирует состоятельность компенсаторно-приспособительных возможностей организма и имеет саногенетическую направленность. Ее можно охарактеризовать как стадию активации адаптационных резервов [1].

Отравления средней тяжести сопровождаются нарушением функций центральной нервной системы, наблюдается двухкратное увеличение количества показателей гомеостаза, а также величин факторных нагрузок большинства признаков во всех трех группах факторов, что отражено в таблице 2 [1].

В первой группе факторов, наряду с основными показателями активации систем естественной детоксикации, появляется МОС, что указывает на существенное значение функционального состояния системы кровообращения, что носит компенсаторный характер, направленный на поддержание эффективности гемоциркуляции в условиях развивающейся гиповолемии и нарушения бронхиальной проходимости. Показатель АОАК в первой группе факторов имеет невысокую нагрузку, что указывает на умеренную напряженность системы антиоксидантной защиты в связи с нарастающей активностью процессов ПОЛ [1].

Вторая и третья группы факторов демонстрируют, что нарушения циркадного ритма секреции гормонов гипофизарно-надпочечниковой оси на этом этапе вносят значительный вклад в формирование адаптационных реакций.

Появление среди значимых факторов, определяющих характер течения и исход острого отравления, показателей эндотоксемии, может свидетельствовать о развитии недостаточности естественных механизмов детоксикации.

Таблица 2. Функциональная система при отравлениях психотропными препаратами средней тяжести (n=218)

№ п/п	Признак	Группы факторов		
		I	II	III
1	2	3	4	5
	Глазго	0,42		
	БЭАГМ	0,47		
	АКТГ, утро		0,49	
	АКТГ, вечер		0,80	
	Кортизол, утро			0,42
	Кортизол, вечер			0,49
	МОС	0,58		
	ОПСС		0,43	
	$ОФВ_1$		0,50	
	ЛИИ		0,43	
	АЛТ			0,51
	АСТ		0,53	
	ЛДГ		0,40	
	АОАК	0,42		
	Лейкоциты		0,45	
	Т-лимф.		0,41	
	Ig A		0,42	
	Ig M	0,49		
	Ig G		0,50	
	ФП-30	0,67		
	ФЧ-120			0,41
	АФП-120		0,48	
	Иб-30		0,43	
	ЦПА			0,85

Формирующаяся функциональная система характеризуется выраженным напряжением работы естественных систем детоксикации, вовлечением центральных и нейроэндокринных механизмов регуляции, что может потребовать проведения методов усиления естественной, а в отдельных случаях и использования искусственной детоксикации. С учетом полученных клинических результатов и отсутствием летальности, такую стадию развития компенсаторно-приспособительных процессов при острой химической травме следует охарактеризовать как компенсацию [1].

При тяжелой химической травме психотропными препаратами с благоприятным исходом (табл. 3) все показатели гомеостаза вошли в первую по значимости группу факторов. Это может свидетельствовать о предельных возможностях адаптации организма к воздействию экстремальных факторов [1].

Таблица 3. Функциональная система при отравлениях психотропными препаратами тяжелой степени с благоприятным исходом (n=93)

№ п/п	Признак	Группы факторов		
		I	II	III
1	2	3	4	5
	Глазго	0,45		
	БЭАГМ	0,48		
	АКТГ, утро	0,55		
	АКТГ, вечер	0,49		
	Кортизол, утро	0,77		
	Кортизол, вечер	0,69		
	МОС			0,63
	ОПСС			0,52
	$ОФВ_1$		0,42	
	ЛИИ			0,84
	АЛТ		0,76	
	АСТ	0,47		
	ЛДГ		0,47	
	О. Белок		0,78	
	О. Билирубин	0,42		
	МДА	0,70		
	АОАК	0,70		
	ФГ	0,75		
	Лейкоциты	0,63		
	Т-лимф.	0,52		
	Ig A		0,57	
	Ig M	0,52		
	Ig G		0,53	
	ФП-30	0,48		
	ФЧ-30	0,50		
	ФЧ-120	0,74		
	АФП-120	0,46		
	Иб-30	0,44		
	Иб-120	0,70		
	ЦПА	0,52		

Наибольшие величины факторных нагрузок зарегистрированы у показателей нейроэндокринной регуляции, перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, клеточного и гуморального звена иммунной защиты, а также неспецифической резистентности организма. Вероятно, в связи с истощением детоксикационных систем организм вынужден задействовать большее количество компенсаторных механизмов. Наблюдается конкурентное доминирование различных систем поддержания гомеостаза, то есть отсутствует явный «лидер» [1]. Существующая ситуация может свидетельствовать о недостаточности собственных детоксикационных возможностей организма и требует проведения не только комплекса методов усиления естественной и искусственной детоксикации, но и фармакологической коррекции нарушенных показателей гомеостаза. В целом структура

функциональной системы характеризует субкомпенсацию адаптационных возможностей организма [1]. Это, вероятно, требует дополнительной фармакологической или иной поддержки в отношении тех параметров и физиологических систем, которые испытывают наибольшие нагрузки.

При химической травме психотропными препаратами тяжелой степени с неблагоприятным исходом «факторный портрет» функциональной системы, в целом, идентичен предыдущему, что отражено в таблице 4.

Вместе с тем количество значимых параметров, которые имеют существенное значение в формировании функциональных систем и влияют на исход химической травмы, увеличилось с 30 до 34. Среди механизмов, оказывающих определяющее влияние на развитие и исход травмы, лидируют реакция гипофизарно-надпочечниковой системы (нарушение циркадного ритма секреции АКТГ и кортизола), иммунной системы (клеточные и гуморальные механизмы, неспецифическая резистентность), эндотоксикоз. Об этом свидетельствует состав и величины факторных нагрузок признаков первой группы факторов [1].

Таблица 4. Функциональная система при отравлениях психотропными препаратами тяжелой степени с неблагоприятным исходом (n=127)

№ п/п	Признак	Группы факторов		
		I	II	III
1	2	3	4	5
	Глазго			0,93
	БЭАГМ	0,42		
	АКТГ, утро	0,77		
	АКТГ, вечер	0,91		
	Кортизол, утро	0,95		
	Кортизол, вечер	0,63		
	ТТГ		0,63	
	T_4		0,79	
	Инсулин			0,92
	$СМП_{254}$			0,59
	ЛИИ	0,53		
	АЛТ	0,47		
	АСТ	0,42		
	О. Билирубин	0,42		
	МДА		0,47	
	АОАК		0,59	
	Ht			0,59
	ФГ	0,59		
	Лейкоциты	0,59		
	Т-лимф.	0,58		
	В-лимф.	0,70		
	Ig A	0,57		
	Ig M	0,75		
	Ig G	0,68		
	ФП-30	0,95		

Продолжение таблицы 4.

	ФП-120			0,97
	ФЧ-30			0,99
	ФЧ-120	0,80		
	АФП-30	0,56		
	АФП-120	0,40		
	Иб-30		0,98	
	Иб-120	0,86		
	НСТ	0,80		
	ЦПА	0,98		

Включение во вторую группу факторов ТТГ и T_4, а также в третью инсулина указываетна критические сдвиги в пластических процессах и энергетическом балансе организма, что может свидетельствовать о декомпенсацию адаптационных возможностей организма [1].

Сложность выявленных функциональных связей между исследуемыми параметрами гомеостаза при острых отравлениях демонстрирует кластерный анализ с последующим построением дендрограмм, которые представлены на рисунках 1–3. Кластеризация проводится ступенчато. Два наиболее взаимосвязанных признака объединяются, а затем рассматриваются как один кластер. В дальнейшем аналогичная процедура повторяется на следующем уровне и может закончиться по решению исследователя на определенном шаге или завершиться объединением всех признаков в единый кластер. Естественно, что проводить кластерный анализ массива данных, насчитывающего несколько десятков элементов (функциональных и лабораторных показателей) возможно исключительно с помошью прикладного пакета программ для ЭВМ [1, 8].

Наиболее удобен для этой цели пакет BMDP, который позволяет представить полученные данные в графической форме, в виде дендрограмм. Дендрограмма как способ топологического представления информации представляет собой обобщенный граф структуры функциональных связей систем организма, точки (вершины графа) которого обозначают признаки, а все отрезки прямых линий (ребра графа) характеризуют направление и удаленность связей исследуемых параметров. Дендрограмма отражает соподчиненность, соучастие и взаимодействие различных систем, в которых прослеживается два уровня регуляции: внутрисистемный (между элементами одной системы) и межсистемный [7, 8].

Важно подчеркнуть, что процесс кластеризации начинает выполняться компьютерной программой с того признака, который в их перечне представлен первым. Это может быть исход химической травмы, конкретный функциональный или лабораторный показатель. В данном примере за признак-классификатор принята тяжесть химической травмы [1, 8, 9].

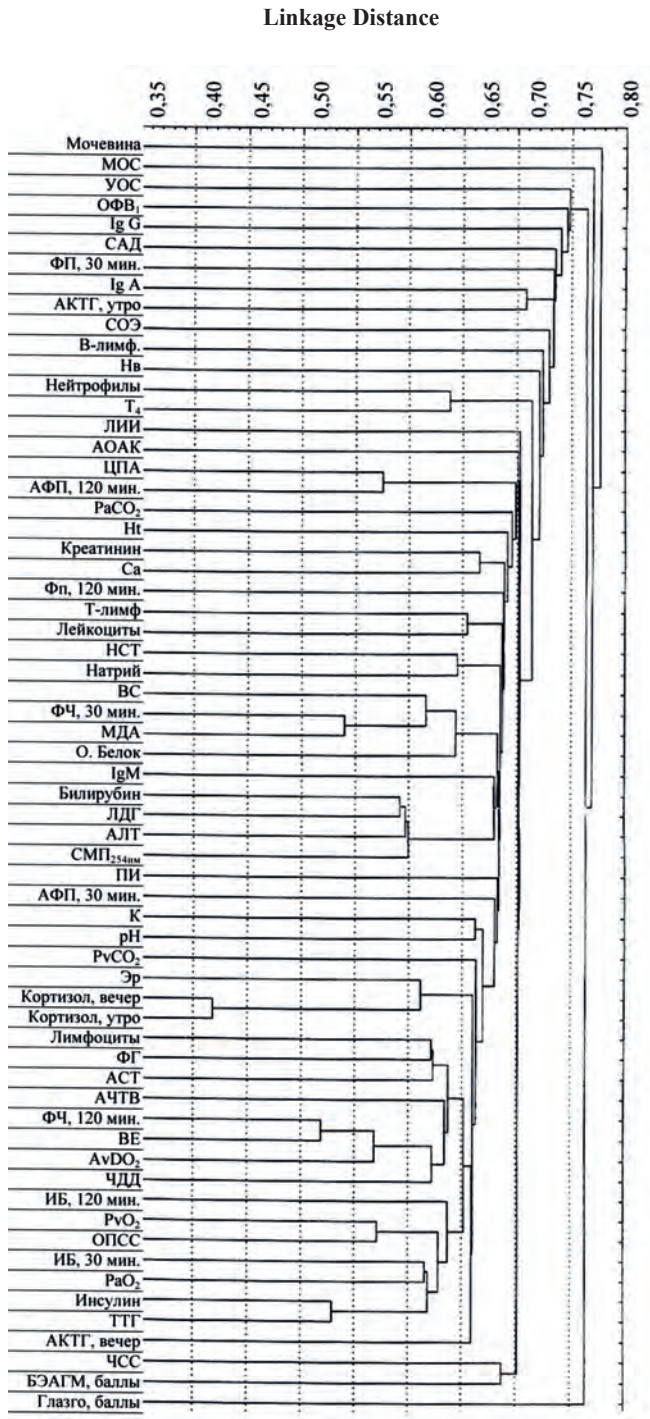

Рисунок 1. Структурный портрет адаптации организма при химической травме психотропными препаратами легкой степени

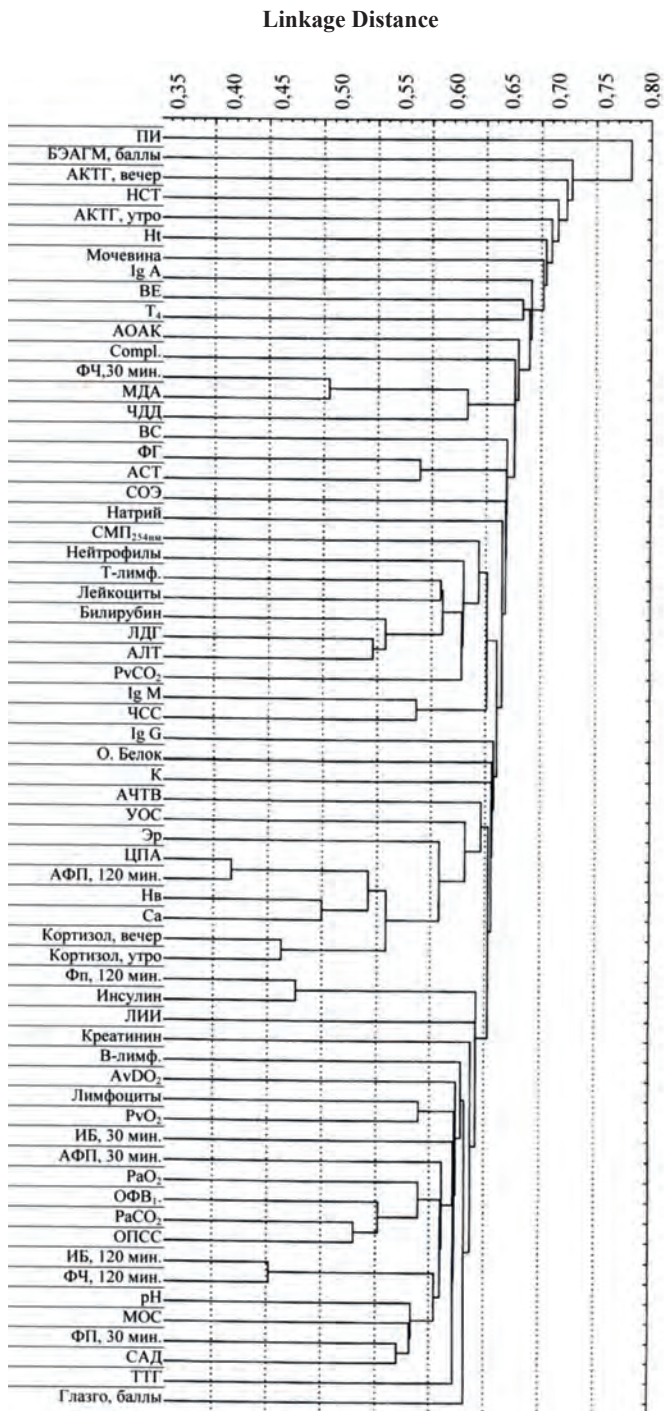

Рисунок 2. Структурный портрет адаптации организма при химической травме психотропными препаратами средней тяжести

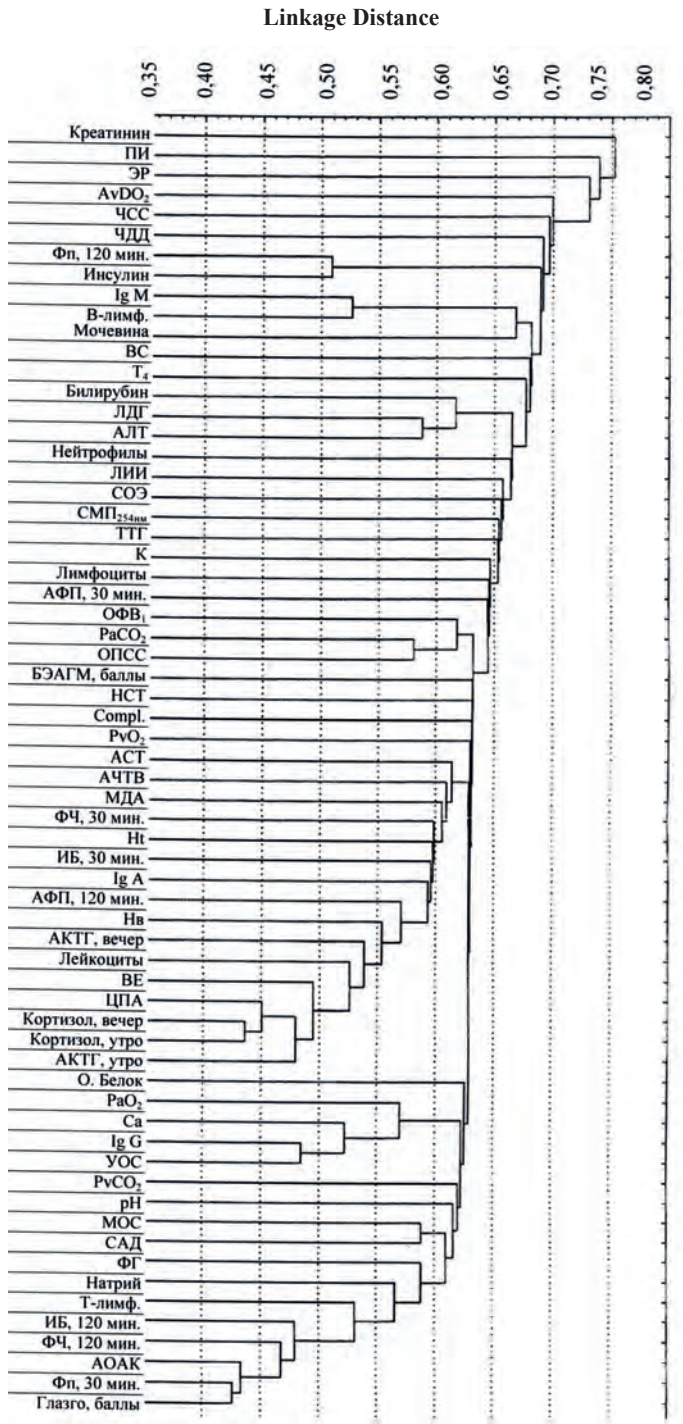

Рисунок 3. Структурный портрет адаптации организма при тяжелой химической травме психотропными препаратами

Учитывая это обстоятельство, не имеет смысла анализировать порядок расположения элементов системы по вертикали – вертикальную иерархию, поскольку он всегда будет меняться при изменении главного, системообразующего показателя и по этой причине является в значительной мере субъективным критерием. Наибольший интерес представляет анализ горизонтальной иерархии, которая демонстрирует взаимозависимость, то есть соподчиненность и соучастие различных подсистем в развитии функциональной системы как отражении адаптационных, то есть неспецифических для химической травмы, процессов. В качестве критерия оценки взаимозависимости выступает величина интервала взаимодействия (linkage distance) параметров, составивших дендрограмму [1, 8].

В таблице 5 представлены величины интервала взаимодействия элементов функциональной системы при различной тяжести отравления.

Таблица 5. Интервалы взаимодействия (linkage distance) отдельных параметров функциональных систем при химической травме психотропными препаратами различной тяжести

Тяжесть химической травмы	Величина интервала взаимодействия		
	M±m (min–max)	Медиана	Мода
Легкая	0,68±0,008[2] (0,45-0,80)	0,70	0,75
Средняя	0,63±0,009[1] (0,45-0,80)	0,65	0,65
Тяжелая	0,59±0,01[1,2] (0,45-0,75)	0,65	0,60

Примечание: 1 - p<0,05 между показателем и аналогичным при химической травме легкой тяжести; 2 – p<0,05 между показателем и аналогичным при отравлении средней тяжести.

Из представленных данных следует, что с нарастанием тяжести химической травмы linkage distance достоверно сокращается, то есть взаимозависимость отдельных показателей гомеостаза возрастает. У пациентов с химической травмой средней и тяжелой степени linkage distance в 1,1–1,2 раза (p<0,05) меньше по сравнению с аналогичным при химической травме легкой тяжести. При тяжелой химической травме – в 1,1 раза (p<0,05) меньше относительно пациентов средней тяжести. Это свидетельствует об увеличении взаимозависимости функциональных подсистем, что является отражением их адаптивной саморегуляции, направленной на выполнение главной целевой функции – сохранение жизни [1].

Как следует из представленных ранее структурных портретов адаптационных процессов, с нарастанием тяжести химической травмы изменяется и пространственная ориентация межсистемных связей формирующихся функциональных систем. Перестройка структуры функциональных связей происходит преимущественно на межсистемном уровне саморегуляции [1].

Таким образом, адаптационные процессы при острых отравлениях психотропными препаратами развиваются по пути конкурентного доминирования преимущественно гомеостатических функциональных систем и перестройки архитектуры межсистемных функциональных связей, что проявляется в увеличении близости взаимодействия и, следовательно, взаимозависимости параметров поддержания гомеостаза. Это существенно повышает вероятность возникновения сбоев в работе каждой системы при возникновении нарушений в другой [1].

Рассматривая адаптационные процессы при острых отравлениях психотропными препаратами с позиций системного анализа, необходимо отметить, что особенностью данного вида химической травмы является пролонгированное действие стресс-фактора. Если при прочих видах экстремальных ситуаций этиологический фактор действует кратковременно и является пусковым механизмом, то в случае химической травмы имеет место дальнейшее действие попавшего в организм химического соединения или его метаболитов, что оказывает влияние на хронологию токсических эффектов. При этом происходит постоянное вовлечение в физиологические процессы дополнительных факторов, которые уже приобретают характер патологических и приводят к развитию опасных осложнений химической болезни [7]. Таким образом, фаза реализации компенсаторных механизмов, которая при прочих видах экстремальных воздействий носит краткосрочный характер, значительно удлиняется [1].

На начальной (токсикогенной) стадии острых отравлений психотропными препаратами активируются, в первую очередь, неспецифические компенсаторные механизмы, что сопровождается нарушениями общих функциональных и лабораторных показателей [9, 15, 22]. Выраженность этих изменений возрастает с тяжестью химической травмы, что позволяет выделить четыре стадии развития адаптационных процессов, а именно: активации, компенсации, субкомпенсации и декомпенсации [1].

Стадия активации характеризуется вовлечением минимального количества механизмов, которые необходимы для естественной детоксикации и быстрого восстановления отклонений в работе различных систем. Такой тип адаптации краткосрочен, физиологичен, имеет саногенетическую направленность и реализуется преимущественно при отравлениях легкой тяжести. В этом случае нарушения высшей нервной деятельности выражены минимально и сочетаются с легкими нарушениями частотно-амплитудных характеристик ЭЭГ. Данное обстоятельство может быть объяснено нейротоксическим действием психотропных препаратов, поскольку нарушения гемодинамики и функции внешнего дыхания незначительны. Изменения в гемограмме отсутствуют. Характерно достоверное увеличение доли нейтрофилов в периферической крови, тогда как остальные показатели иммунограммы не изменяются, что подтверждает значение микрофагоцитов как фактора естественной детоксикации и хорошо согласуется с результатами других авторов [6,12-14]. Их функциональная активность характеризуется достоверным увеличением скорости начальных этапов фагоцитоза и его эффективности, которые через 120 минут инкубации крови достоверно уменьшаются по сравнению с нормой, обнаруживая тенденцию к формированию

патогенетического компонента развития инфекционных осложнений. Увеличение доли клеток, продуцирующих АФК, не сопровождается дисбалансом в системе ПОЛ/АОС, что указывает на достаточность механизмов антиоксидантной защиты и компенсированное состояние перекисного гомеостаза в целом. Со стороны нейроэндокринной регуляции наблюдаются умеренные нарушения циркадного ритма секреции АКТГ и кортизола за счет увеличения их вечерней концентрации, что характерно для критических состояний в целом [23]. Наблюдается достоверное увеличение специфических маркеров эндотоксемии в сыворотке крови, в частности $СМП_{254}$ нм, что указывает на повышение активности катаболических процессов. Вместе с тем концентрация неспецифических маркеров не увеличивается, что характеризует незначительную тяжесть химической травмы и свидетельствует о сохранении детоксикационных функций [1].

Стадия компенсации характеризуется существенными сдвигами функциональных и лабораторных показателей. Расстройства сознания нарастают и сопровождаются выраженными нарушениями БЭАГМ на фоне тахикардии, которая при сниженном УОС обеспечивает относительно высокий показатель МОС. Снижение $ОФВ_1$ свидетельствует о нарушениях функции внешнего дыхания [9]. Регистрируются начальные проявления коагулопатии потребления, что проявляется снижением концентрации фибриногена сыворотки крови и увеличением времени свертывания крови. Данное обстоятельство характерно для критических состояний, описано в научной литературе и свидетельствует о формировании эндотелиальной дисфункции (ЭД), которая может быть связана с ранней активацией иммунных клеток-эффекторов ЭД и гипоксией [16, 17]. Нарушение коагуляционных свойств крови в аспекте формирования ДВС-синдрома может иметь самостоятельное патогенетическое значение и определить исход химической болезни. Наблюдается быстрая перестройка механизмов иммунной защиты, направленная в сторону активации клеточных (неспецифических) ее механизмов, что проявляется в достоверном увеличении количества лейкоцитов периферической крови, доли нейтрофилов и снижении субпопуляции Т-лимфоцитов. Наблюдается достоверное уменьшение концентрации Jg G [1]. Такая тенденция, в целом, характерна для критических ситуаций и характеризует значительное напряжение работы иммунных механизмов естественной детоксикации с начальными проявлениями предела ее функциональных возможностей.

В отличие от стадии активации стадия компенсации сопровождается дисбалансом в системе ПОЛ/АОС, что проявляется достоверным увеличением количества продуктов пероксидации липидов клеточных мембран в плазме крови и снижением ее антиоксидантного потенциала, что, безусловно, имеет патогенетическое значение. Концентрация гормонов гипофизарно-надпочечниковой оси, ТТГ, $Т_4$ и инсулина соответствует норме, однако продолжает нарастать десинхронизация ритмов секреции АКТГ и кортизола за счет дальнейшего увеличения их вечерней концентрации. Количество специфических и неспецифических маркеров эндотоксемии в сыворотке возрастает, что свидетельствует о преобладании катаболических процессов и формировании недостаточности детоксикационных механизмов [1].

Стадии субкомпенсации и декомпенсации характеризуются максимальными изменениями различных функциональных и лабораторных параметров гомеостаза, что свидетельствует о критических нагрузках на организм. Срыв компенсаторных механизмов, который завершается летальным исходом, развивается в короткий временной промежуток, что делает невозможным различить эти две стадии на ранних этапах химической болезни. Наблюдаются глубокие нарушения сознания и грубые изменения БЭАГМ, которые свидетельствуют о значительном нарушении клеточного метаболизма и сочетаются с выраженной тахикардией, которая при снижении УОС уже не в состоянии обеспечить адекватный потребности МОС. Нарушение вентиляционной функции на уровне терминальных отделов бронхиального дерева подтверждается снижением $ОФВ_1$ и рентгенологически. Сравнительный анализ функциональных показателей у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом не выявил достоверных различий, что не позволяет использовать их с прогностической целью. Срыв компенсаторных механизмов возможен в любой момент, ситуация нестабильна и характеризует индивидуальные особенности организма [1].

В гемограмме существенных отклонений не регистрируется, однако нарастает коагулопатия потребления. Участие иммунной системы в реализации адаптационных реакций признается одним из ключевых механизмов и было описано Г. Селье (1972) как инволюция тимуса и лимфатических узлов [24, 25]. Для суб- и декомпенсации адаптационных возможностей характерна типичная реакция лимфоцитарного звена. Уменьшается количество всех субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, однако концентрация в сыворотке крови Jg A и Jg M еще не снижена. Регистрируется уменьшение количества Jg G в крови. По современным представлениям, адаптивная перестройка лимфоидных органов определяется активностью нейроэндокринной системы и на начальном этапе заключается в деструкции лимфоидной ткани, что необходимо для стирания памяти о специфичности предшествующего состояния – т. е. стирание старого следа адаптации и возможности дифференцировки новых, адапатированных, форм лимфоцитов [26, 30, 31]. При острых отравлениях психотропными препаратами не обнаружено достоверных различий иммунологических показателей среди пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом химической болезни, что может свидетельствовать об отсутствии значения только количественных показателей состояния системы в реализации компенсаторных механизмов [1].

Начиная с работ Г. Селье (1972), многочисленными исследователями показано, что наиболее важный регулятор адаптационных реакций при различных видах стресса – гипоталямо-гипофизарно-надпочечниковая система, а кортизол – основной гормон стресса. Сегодня принята точка зрения, в соответствии с которой реакция ГНС определяется нервной импульсацией, которая возникает в соответствующих рецепторах (холодовые, болевые, мышечные и пр.), затем поступает в промежуточный мозг, и там происходит преобразование нервного импульса в гормональный, секретируется кортиколиберин, который стимулирует синтез и секрецию АКТГ и, впоследствии, кортизола [18, 19, 21, 23, 27, 29]. Вместе с тем психотропные препараты оказывают специфическое действие на структуры ЦНС, в связи с чем особый интерес представляет изучение процессов нейроэндокринной регуляции

при данном виде травмы с точки зрения их участия в формировании компенсаторно-приспособительных реакций [1].

Стадии суб- и декомпенсации характеризуются максимальными проявлениями нарушений циркадного ритма секреции АКТГ и кортизола за счет повышения вечерней концентрации последних. Вместе с тем, у обследованных пациентов уровень АКТГ и кортизола в крови как в утреннее, так и в вечернее время соответствовал норме. Следовательно, ГНС активно участвует в реализации стресс-реакций, направленных на переключение пластических процессов на энергетические, индукцию лизиса тимико-лимфоидной ткани, торможение активности иммунной системы, усиливая при этом синтез ферментов обмена аминокислот, глюконеогенез, липолиз, повышая возбудимость структур головного мозга [29].

Острые отравления, в том числе психотропными препаратами, сопровождаются развитием эндотоксемии [15, 20]. Эндотоксиканты являются шокогенным фактором, который оказывает влияние на процессы компенсации и приспособления к новым условиям жизнедеятельности [3-5, 16, 17]. Стадии суб- и декомпенсации характеризуются максимальными концентрациями специфических и неспецифических маркеров эндотоксемии в сыворотке крови, что объясняется глубокими нарушениями энергетического и пластического обмена, активацией процессов ПОЛ и иммунной системы. Значимых различий между лабораторными критериями эндотоксемии у пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом не обнаружено, что делает невозможным использование данных показателей для определения стадии адаптационных реакций [1].

Без системного подхода, основанного на теории функциональных систем П.К. Анохина (1972), невозможно определить вклад каждого параметра в развитие компенсаторных механизмов и, следовательно, оптимизировать комплекс лечебно-диагностических мероприятий [2].

Факторный анализ позволил выявить, что формирование функциональных систем как отражение адаптационных реакций происходит по принципу достаточности-недостаточности полученного полезного результата, под которым следует понимать восстановление нарушенных показателей гомеостаза, на что указывал Дагаев В.Н. (2001) [1, 7, 9].

Для стадии активации достаточно механизмов естественной детоксикации, в первую очередь иммунных и процессов ПОЛ. Данные системы испытывают при этом наибольшую нагрузку. В стадии компенсации повышенные требования предъявляются и к другим системам. В два раза возрастает количество параметров, формирующих функциональную систему, увеличиваются нагрузки на регуляторные системы, а именно центральную нервную и нейроэндокринную. Кроме того, ведущее значение приобретает транспортная, антиоксидантная и иммунная функции, что отражает матрица факторных нагрузок. Таким образом, меняется иерархия взаимоотношений различных показателей, взамен гомеостатических появляются начальные признаки доминирования морфофункциональных систем [1, 9].

На стадии субкомпенсации продолжает увеличиваться количество показателей, участвующих в реализации компенсаторных реакций, и возрастают их факторные нагрузки. Доминирующими становятся центральные,

нейроэндокринные и иммунные механизмы, активация систем ПОЛ и АОС, эндотоксемия, о чем свидетельствует состав первой группы факторов. Характер сформированной функциональной системы демонстрирует не только приоритет механизмов естественной детоксикации, их высокое напряжение, но и попытки системы запустить процессы восстановления поврежденных структур за счет оптимизации пластического и энергетического обмена, ограничения самоповреждающего действия иммунной системы, о чем свидетельствует появление в первой группе факторов кортизола [1, 9].

При декомпенсации в формировании функциональных систем доминируют центральные нервные, нейроэндокринные, иммунные механизмы, эндотоксемия. Взаимозависимость основных параметров работы указанных систем критически возрастает. Главным отличием этой функциональной системы от предыдущих является участие в ее формировании гормонов щитовидной железы и инсулина, которые непосредственно обеспечивают основной и углеводный обмен, что указывает на крайнее напряжение пластических процессов [1, 9].

С помощью кластерного анализа подтверждено, что с нарастанием тяжести химической травмы меняется архитектура функциональных систем, а именно возрастает взаимозависимость различных элементов, ее составляющих. Следовательно, возникают ограничения ее динамики. Изменение одного параметра с большой вероятностью приведет к изменению целого ряда других и увеличивает риски каскадного «обрушения» критически важных показателей гомеостаза. Такое положение, когда сдвиг одного кластера может закончиться обрушением всей системы (принцип домино), свидетельствует о декомпенсации адаптационных резервов организма [1].

С позиций клинической физиологии, системный подход к анализу адаптационных процессов при острых отравлениях психотропными препаратами демонстрирует, что активация, компенсация, суб- и декомпенсация компенсаторно-приспособительных возможностей организма определяется характером формирующихся функциональных систем и их внутренней архитектурой [1]. В критической ситуации, при высоком уровне взаимозависимости различных элементов доминирующей функциональной системы, незначительное изменение любого параметра гомеостаза повышает риск дезинтеграции всего комплекса механизмов поддержания жизнедеятельности и, соответственно, неблагоприятного исхода.

Конечно, представленные сведения не претендуют на исчерпывающую полноту, но полагаем, что они могут быть полезны с точки зрения понимания и дальнейшего обсуждения механизмов реализации компенсаторно-приспособительных процессов при экстремальных состояниях организма вследствие острой химической травмы, а также демонстрируют новые возможности для последующих исследований.

Список литературы

1. *Алехнович, А.В.* Компенсаторные механизмы и приспособительные процессы при острых отравлениях психотропными перпаратами. Издание второе/А.В. Алехнович, В.Б. Иванов, К.К. Ильяшенко, А.Н. Ельков//М.; 2022. – 200 с.

2. *Анохин, П.К.* Очерки по физиологии функциональных систем / П.К. Анохин. – М., 1975. – 447 с.

3. *Голиков, С.Н.* Патологическая физиология экстремальных состояний при экзогенных интоксикациях / С.Н. Голиков // Патофизиологическая физиология экстремальных состояний /под. ред. П.Д. Горизонтова, Н.Н. Сиротина. – М.: Медицина, 1973. – С. 267–289.

4. *Голиков, С.Н.* Актуальные проблемы современной токсикологии // Фармакол. и токсикол. – 1981. – № 6. – С. 645–650.

5. *Голиков, С.Н.* Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В. Саноцкий, Л.А. Тиунов. – Л.: Медицина, 1986. – 280 с.

6. *Гребенюк, А.Н.* Нейтрофил и экстремальные воздействия / А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич, В.Ф. Беженарь [и др.]. – СПб., 1998. – 215 с.

7. *Дагаев, В.Н.* Клиническая токсикометрия острых отравлений / В.Н. Дагаев, Е.А. Лужников, В.И. Казачков. – Екатеринбург: Изд-во «Чароид», 2001. – 182 с.

8. *Ельков, А.Н.* Опыт применения факторного анализа в клинической токсикологии/А.Н. Ельков, К.К. Ильяшенко, Ю.С. Гольдфарб и др. – Препринт института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, 2005. – №127. – 32 с.

9. *Ильяшенко, К.К.* Токсическое поражение дыхательной системы при острых отравлениях и его лечение // Неотложная клиническая токсикология / под ред. Е.А. Лужникова. – М.: «Медпрактика-М», 2007. – С. 66 – 76.

10. *Казначеев, В.П.* Донозологическая диагностика в практике массовых обследований населения / В.П. Казначеев, Р.М. Баевский, А.П. Береснева. – Л.: Медицина, 1980. – 208 с.

11. *Казначеев, В.П.* Этюды к теории общей патологии /В.П. Казначеев, М.Я. Субботин. – Новосибирск: СО РАМН, 2006. – 255 с.

12. *Лужников, Е.А.* Детоксикационная терапия: руководство для врачей / Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, С.Г. Мусселиус. – СПб.: Лань, 2000. – 192 с.

13. *Лужников, Е.А.* Основы реаниматологии при острых отравлениях / Е.А. Лужников, В.Н. Дагаев, Н.Н. Фирсов. – М.: Медицина, 1977. – 375 с.

14. *Лужников, Е.А.* Острые отравления: руководство для врачей / Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2000. – 434 с.

15. *Марупов, А.М.* Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях // Неотложная клиническая токсикология / под ред. Е.А. Лужникова. – М.: «Медпрактика-М», 2007. – С. 182 – 199.

16. *Маянский, Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге / Д.Н. Маянский, Д.Н. Маянская. – Новосибирск: Наука, 1983. – 256 с.

17. М*аянский, Д.Н.* Лекции по клинической патологии: руководство для врачей / Д.Н. Маянский. – М.; «ГЭОТАР-Медиа», 2008. – 464 с.

18. *Меерсон, Ф.З.* Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1981. – 278 с.

19. *Меерсон, Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – 269 с.

20. *Нарзикулов, Р.А.* Особенности развития и течения эндотоксикоза у больных с острыми тяжелыми отравлениями лекарственными средствами нейротропного действия при использовании эфферентных методов детоксикации / Р.А. Нарзикулов, Г.А. Ливанов, М.Я. Малахова // Неотложная клиническая токсикология / под ред. Е.А. Лужникова. – М.: «Медпрактика-М», 2007. – С. 200–207.

21. *Панин, Л.Е.* Биохимические механизмы стресса / Л.Е. Панин. – Новосибирск: Наука, 1983. – 233 с.

22. *Савина А.С.* Поражение сердца при острых отравлениях химической этиологии // Неотложная клиническая токсикология / под ред. Е.А. Лужникова. – М.: «Медпрактика-М», 2007. – С. 104–117.

23. Сапронов, Н.С. Фармакология гипофизарно-надпочечниковой системы / Н.С. Сапронов. – СПб.: Специальная литература, 1998. – 336 с.

24. *Селье, Г.* Стресс без дистресса / Г. Селье. – М.: Прогресс, 1982. – 128 с.

25. Селье, Г. Очерки об адаптационном синдроме: пер. с франц. / Г. Селье. – М.; 1990. – 254 с.

26. *Селятицкая, В.Г.* Эндокринно-лимфоидные отношения в динамике адаптивных процессов / В.Г. Селятицкая, Л.А. Обухова. – Новосибирск: СО РАМН, 2001. – 168 с.

27. *Страхов, С.И.* Особенности адаптационно-компенсаторных реакций организма при острых отравлениях психотропными средствами у детей // Неотложная клиническая токсикология: руководство для врачей / под. ред. Е.А. Лужникова. – М.; Медпрактика-М, 2007. – С. 42–49.

28. *Судаков, К.В.* Информационный феномен жизнедеятельности. М. : Изд-во Рос. мед. акад. постдиплом. образования, 1999. – 380 с.

29. *Филаретов, А.А.* Принципы и механизмы регуляции гипофизарноадренокортикальной системы / А.А. Филаретов. – Л.; Наука, 1987. – 165 с.

30. *Фурдуй, Ф.И.* Физиологические механизмы стресса и адаптации при остром действии стресс-факторов / Ф.И. Фурдуй. – Кишинев: Штиинца, 1986. – 239 с.

31. *Хаитов, Р.М.* Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. – М.: ВНИРО, 1995. – 211 с.

Глава 10. Клиническая физиология и фармакология

С.Б. Середенин, Ю.В. Вахитова

1. Введение

Заглавие раздела, предусмотренное проектом издания, определяет на первый взгляд дискретное рассмотрение научных направлений. Однако цель настоящей статьи, в вольном стиле суммирующей ряд общеизвестных фактов, прямо противоположная. С нашей точки зрения, клиническая физиология и фармакология представляют собой единый континуум, включающий общие цели и задачи, объект исследований, методические подходы, теоретическое и прикладное значение результатов.

Появление в сочетании с термином «физиология» слова «клиническая» подразумевает направленность на больного человека. С одной стороны, это очевидно и понятно, и именно в таком аспекте обсуждалось в 1954 году на сессии АМН СССР. Но для рассмотрения темы необходимо определение больного человека. Понимание состояния болезни непостоянно и динамично изменяется с приобретением новых знаний, с трансформацией субъективных и объективных оценок, определяемых в том числе и социальными отношениями. Поэтому взаимосвязь клинической физиологии и фармакологии в историческом аспекте уместно рассмотреть, используя понятие направленной регуляции экзогенными веществами фенотипа состояния, полагаемого нормальным или измененным на актуальный момент времени. При таком допущении видно, что анализируемая взаимосвязь уходит корнями в глубокую древность.

2. Исторические предпосылки

Информация о применении растений для лечения болезней обнаруживается в клинописных табличках, в иероглифах Древних Месопотамии и Египта, относящихся ко 2-му тысячелетию до нашей эры. В библейских историях, например, описывается применение бальзама для лечения язв (Иеремия, 8, 22, 46, 11, 51, 8), врачевание царя Езекия инжиром (II Царств 20;7). Существуют свидетельства, что царь Газера (Палестина, 14 г. до н. э.) просил мирровую камедь (*C. Commiphora* sp.) из Египта для исцеления [29:29]. Пыльца трех лекарственных растений – мяты, шалфея и мирты – обнаружена в человеческих фекалиях из Мегиддо (поздний бронзовый век, 12-11 вв. до н. э.), по Longgut et. al. (2016) это указывает на возможное использование различных видов травяных чаев. В Ханаанском дворце в Тель-Кабри в винных кувшинах найдены добавки, содержавшие мед, смолу теребинта (*Pistacia lentiscus/palestina*), кедровое масло (*Cedrus libani*) и можжевельник (*Juniperus communis/J. phoenicea*), а также мяту, мирт и/или корицу. Предполагается, что вещества использовались для сохранения вина и в качестве лекарств (1900–1600 гг. до н. э.).

С древних времен известны приемы изменения сознания людей. Психоделики использовали в Египте, в Индии, в Греции в ритуальных церемониях, а также в медицинских целях. Коренные народы Америки, племена чичимека, циголь, тараумара применяли небольшой кактус пейот (*Lophophora williamsii*). Найдены образцы 3780–3660 гг. до н. э., содержащие мескалин (3,4,5-триметилоксифениламин). Другой галлюциногенный алкалоид псилобицин встречается на всех континентах в грибах рода *Psilocybe*. Используется в религиозных ритуалах, в шаманских практиках с древних времен, а в настоящее время рассматривается в качестве возможного средства лечения алкогольных расстройств, табачной зависимости, депрессии.

В ритуалах Старого Света 2000 до н. э. применяли гриб *Amanita muscaria*, содержащий мускарин. Люди поклонялись богу Сома, чье присутствие на Земле проявлялось в грибе. Ритуал включал приготовление сока из грибов, который употребляли священники, далее их моча собиралась и выпивалась участниками церемонии.

Сушеные листья *Nicotiana tabacum* содержат никотин, в низких дозах вызывающий стимулирующее действие, а в высоких – депрессивное, также известен с глубокой древности.

Крайняя степень изменения фенотипа – смертельное отравление, сопутствует истории развития человечества. Например, ядовитый алкалоид кониин (Coniine) содержится в болиголове пятнистом (*Conium maculatum*). Соком болиголова греки казнили преступников и политических врагов. В 399 г. до н. э. болиголовом был отравлен Сократ, в 65 г. для самоубийства, по приказу Нерона, болиголов использовал Сенека.

Увлекательные изыскания в древности можно было бы продолжить, однако из уже приведенных сведений можно определить основные траектории взаимодействия клинической физиологии и фармакологии. Лечебное применение экзогенных продуктов, направленное на коррекцию признаков болезни, на уровне древних знаний – это боль, раны, нарушения сна и другие отклонения от воспринимаемой в те времена нормы. Далее психологическое вмешательство с использованием психоактивных средств и, наконец, токсические воздействия. С течением веков эти линии взаимосвязи развивались и дополнялись.

Кратко упомянем античность. В этот период появились первые материалистические представления о болезни (клиническая физиология), накапливались сведения о веществах, используемых в лечебных целях (фармакология).

Материалистические подходы развивались в трудах Гиппократа, Аристотеля. Евклид предложил геометрические модели зрения. Важными были исследования Герофила, впервые применившего анатомическое вскрытие. Обобщение имевшихся анатомо-физиологических знаний и мощный импульс их развитию придал Гален, заложивший основы экспериментальной физиологии в исследованиях на обезьянах, свиньях, с экстраполяцией результатов на человеке. Учение Галена доминировало до 16 века.

В трудах Гиппократа было описано 300 лекарственных растений. А *Materia medica* Диоскорида рассматривалась основой науки о лекарствах до 19 века. Фармацевтические идеи Галена о выделении полезных веществ из природного материала, применяемого для врачевания, актуальны до сегодняшнего

дня. В пример можно привести Нобелевскую премию Юю Ту 2015 году, выделившей антималярийный препарат из экстракта китайской полыни.

Учение Галена скорректировано и развито в трудах Андреаса Везалия и его учеников. В 17 веке Гарвей предложил теорию кровообращения, заложил основы эмбриологии. С изобретением микроскопа в 16 веке создана клеточная теория, открыта роль микроорганизмов как причина заболеваний.

Таким образом, в греко-римский период и в Средние века основные линии взаимосвязи наук, предшественников клинической физиологии и фармакологии не изменились, хотя в обеих областях имелось значительное накопление как теоретических, так и практических знаний. В отдельные направления выделяются токсикология, наркология, хотя и здесь остаются задачи защиты и лечения, методология их решения включает фармакологические подходы.

3. Взаимовлияние клинической физиологии и фармакологии

Стремительное развитие науки с конца 19 века описать невозможно, поэтому в рамках заданной темы целесообразно привести примеры взаимопроникновения клинической физиологии и фармакологии.

Цитируем академика АМН СССР Михаила Давыдовича Машковского: «В последние десятилетия накоплено много ценных сведений о физиологических, биохимических, физико-химических основах действия лекарственных средств, их взаимодействия с клеточными рецепторами, влияния на мембраны и ионные каналы, на внутриклеточные процессы, синаптическую передачу нервного возбуждения и др. Были открыты α и β адренорецепторы и их подгруппы, дофаминовые, серотониновые, мускариновые, гистаминовые рецепторы, рецепторы ГАМК, опиатные рецепторы, рецепторы эстрогенов, андрогенов и других гормонов и т. д., было показано, что связывание (лигирование) с этими рецепторами является первичным звеном действия соответствующих лекарственных средств. Обнаружено наличие в организме ряда ранее неизвестных физиологически высокоактивных эндогенных соединений, медиаторов, простагландинов, нейропептидов, кининов и др. Установлено, что действие многих лекарственных средств обусловлено их влиянием на биосинтез и метаболизм этих эндогенных соединений, на их связывание соответствующими рецепторами. Все эти и другие данные сыграли большую роль не только в выяснении механизмов действия лекарств, но и в создании высокоактивных лекарственных препаратов. Ряд современных лекарственных препаратов получен путем воссоздания молекул эндогенных соединений или модификацией их структуры». Михаил Давыдович писал об этом в 1993 году. Очевидно, что через 30 лет сказанное можно дополнить, однако цитата полностью характеризует взаимосвязь физиологического и фармакологического направления в науке.

3.1. Фармакологические мишени

Установленные в фундаментальных физиологических исследованиях механизмы жизнедеятельности и выявленные в клинико-физиологических

исследованиях отклонения от нормы открыты для фармакологической регуляции, основу которой составляет рецепторная теория. Взаимопроникновение физиологии и фармакологии отражается еще и в том, что многие рецепторы были охарактеризованы по эффектам различных экзо- и эндогенных соединений.

На сегодняшний день выделяют 4 основных механизма, по которым экстраклеточный лиганд регулирует внутриклеточные процессы. Первой, наиболее сложной, является рецепторная система, связанная с G-белками. Она состоит из трансмембранного рецептора, к которому лиганд присоединяется на поверхности клетки. После этого рецептор сопрягается с расположенным на внутренней поверхности мембраны гуанин-нуклеотид связывающим белком (G-белком), который регулирует эффекторный фермент, генерирующий внутриклеточный вторичный мессенджер.

Второй тип рецепторной системы – рецепторы, связанные с тирозинкиназой. Они представляют собой трансмембранные рецепторы, в которых внутриклеточная часть обладает ферментативной активностью, аллостерически регулируемой лигандным связыванием на внешнем, по отношению к мембране участке рецептора.

Третий тип – наиболее простая система – это регулируемый лигандом трансмембранный ионный канал. Его открытое состояние определяется прямым связыванием лиганда с экстраклеточным участком каналообразующих белков.

Четвертый тип – характерен для жирорастворимых лигандов. В этом случае проникший через мембрану лиганд связывается с внутриклеточным рецептором, далее этот комплекс присоединяется к специфическому участку ДНК в ядре и регулирует транскрипцию.

Пострецепторные системы вторичных мессенджеров обеспечивают трансдукцию сигнала, ведущего к активации и/или изменениям экспрессии эффекторных белков.

Сегодня номенклатура Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR) включает 1055 рецепторов, регулирующих внутриклеточные процессы. Известно 8079 соединений с лигандными свойствами, из них 1764 используются в качестве субстанций лекарственных средств.

По Д.А. Харкевичу среди лекарств, влияющих на рецепторы, по действию в отношении физиологического лиганда выделяют агонисты, антагонисты, частичные агонисты, конкурентные и неконкурентные антагонисты.

Другой объект, общий для физиологии, клинической физиологии и фармакологии, – ферменты.

Ферменты – физиологические катализаторы, участвуют во всех процессах, протекающих в биологических системах, включая метаболизм, рост и деление клеток, передачу сигнала. Многие из них служат мишенями для лекарств, четверть из которых – ингибиторы ферментов.

Лекарственные вещества действуют как необратимые, так и обратимые ингибиторы ферментов. В первом случае ферментативная реакция может возобновиться при синтезе новых молекул фермента, однако при ограниченной стабильности связи ингибитора с ферментом в течение времени может

произойти активация фермента. Обратимые ингибиторы конкурируют с субстратами за связывание с активным центром фермента, конечный результат определяется сродством к ферменту и концентрациями ингибитора и субстрата. Необратимое ингибирование фармакологически более эффективно, чем обратимое, однако при этом более вероятен риск токсических эффектов.

В фармакотерапии, например, пенициллин – ингибитор транспептидазы пептидогликана – положил начало эре антибиотиков. В 1970-х годах разработаны ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), составившие одну из основных групп антигипертензивных средств (каптоприл, эналаприл, лизиноприл). С конца 80-х годов при дислипидемиях применяют ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы (статины). Ингибиторы ВИЧ протеазы (индинавир, саквинивир, ритонавир) позволили увеличить продолжительность и качество жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 применяются в фармакотерапии сахарного диабета. Разработаны ингибиторы киназ пострецепторных путей для лечения онкологических, аутоиммунных заболеваний. Дальнейшее выяснение в клинико-физиологических исследованиях патогенетической роли ферментов может стать основой для разработки новых лекарств.

Необъятная область сопряжения клинической физиологии и фармакологии – воздействие на белковые образования, патогенетическое значение которых доказано. В этом случае успешно применяются иммуно-фармакологические методы, моноклональные антитела. Рассматриваются возможности фармакологической регуляции шаперонов, поддерживающих структуру и функцию физиологически важных белков. Например, физиологический анализ роли шаперона σ_1 рецептора и обнаружение его способности к лигандной активации позволили выявить механизм действия анксиолитика фабомотизола, охарактеризовать его нейропротекторные свойства.

К клинико-физиологической области следует отнести физиологические отклонения, установленные генетическими методами. Сегодня это направление одно из самых актуальных как для клинической физиологии, так и для фармакологии, имеющее как фундаментальное, так и прикладное значение.

3.2. Генетические аспекты клинической физиологии и фармакологии

Достижения молекулярной биологии и генетики в изучении структуры геномов и генов человека и других высших организмов и стремительное развитие генных и клеточных биотехнологий способствовали развитию новых научных направлений, связанных с изучением молекулярной природы патогенеза моногенных, генетически обусловленных мультифакториальных заболеваний, а также принципиально новых методов их диагностики и лечения. Широкомасштабные исследования, в том числе с использованием методологий полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), полногеномного, экзомного секвенирования, в достаточно короткие сроки способствовали идентификации генов, их аллелей и генотипов, ассоциированных со многими распространенными заболеваниями, в ряде случаев способствовали выявлению возможных мишеней лекарственного воздействия. В то же время,

несмотря на расшифровку генома человека, выявление мутаций, полиморфных аллелей генов, «генных сетей», исследований эпигенетической изменчивости, к настоящему времени не так много известно о функциях генов и о функциональной значимости изменений в нуклеотидных последовательностях генов применительно к этиологии и патогенезу мультифакториальных заболеваний. Недостаток представлений о физиологических функциях генов и кодируемых ими белков, особенно их «мутантных» вариантах, и, что более значимо, об ассоциациях с определенным фенотипом и вкладе в патогенез заболеваний, ограничивает возможности выбора мишеней для разработки новых лекарственных средств. Таким образом, приоритетной задачей на данный момент является идентификация ключевых для патогенеза биомолекул из выявленного массива «druggable» (поддающихся лекарственному воздействию) мишеней, клинико-физиологическое доказательство их вовлеченности в развитие заболевания (функциональная валидация) и, в удачном случае, разработка на этой основе новых лекарственных средств. Решение данной задачи осложняется, прежде всего, тем, что разнообразие мутаций одного и того же гена может обуславливать гетерогенность фенотипических проявлений заболевания, для многих генов описаны мутации «высокого» и «низкого» риска, что определяет различные клинические проявления. Кроме того, условно «этиологические» мутации и «предрасполагающие» полиморфные аллели формируют фенотип при взаимодействии с факторами окружающей среды.

На данный момент существует три основных подхода к анализу генотип-фенотипических корреляций между мутациями/полиморфными вариантами генов и клиническими проявлениями заболевания для установления этиологического и патогенетического значения отдельных генов и их аллельного состояния. В их числе – разработка и использование экспериментальных моделей, имитирующих симптомы заболеваний человека, на основе трансгенных и нокаутных животных. Второй подход основывается на анализе генов-кандидатов, на сравнительных ассоциативных исследованиях геномов пациентов и здоровых индивидуумов, результаты которых суммированы в общедоступных базах данных [https://www.ebi.ac.uk/gwas/], а также обобщены в исследованиях международного проекта «HapMap», целью которого являлось создание геномной карты гаплотипов. С целью идентификации генов предрасположенности, их мутаций и полиморфных аллелей часто используется метод направленного функционального картирования, основанный на сравнении по типу «случай-контроль» частот аллелей в генах-кандидатах у здоровых и у больных с изучаемым мультифакториальным заболеванием. Такой подход был применен ко многим распространенным мультифакториальным заболеваниям (атеросклероз, диабет 2-го типа, метаболический синдром, астма, мигрень, депрессия, шизофрения, тревожные расстройства, шизофрения, аутизм, псориаз, рассеянный склероз, системная красная волчанка, некоторые формы онкологических заболеваний), предложены предикторные панели генов-кандидатов, установлены частоты нормальных и «патогенных» аллелей, в том числе – в различных этнических группах. Однако невысокая статистическая достоверность, низкая воспроизводимость, неполный охват всех возможных генов-кандидатов и их полиморфизмов, отсутствие

критериев для заключения о зависимости нозологической формы заболевания от генотипа до настоящего времени не позволяют оценивать значимость полученных результатов с практических позиций. Полногеномный анализ ассоциаций на больших выборках пациентов и группах здорового контроля, а также параллельное полногеномное секвенирование, при котором результаты анализа ДНК индивидуумов сопоставляются с клиническими, биохимическими и другими исследованиями, позволили выявить спектры редких мутаций при мультифакториальных заболеваниях, идентифицировать возможные прогностические биомаркеры, что дополнило гипотезы о генетических ассоциациях с патогенезом заболевания, но требуют дополнительных клинико-физиологических исследований.

Более продуктивными оказались подходы с изучением моногенных (менделевских) заболеваний как отправной точки для идентификации и физиологической характеристики мишеней, поскольку именно при моногенных заболеваниях известные одиночные мутации определенного гена приводят к нарушению функций соответствующего белка, дестабилизации функционирования сопряженных метаболических систем и формированию фенотипа, характерного для конкретной патологии. Именно в случае моногенных заболеваний с установленным первичным молекулярным дефектом (редкие мутации с высокой пенетрантностью) возможна клинико-физиологическая оценка последствий на биохимическом уровне, определение лимитирующих факторов патологического процесса и корреляций с особенностями фенотипа на уровне организма, что, в свою очередь, ведет к валидации мишеней. Так как следствиями эффекта точковых мутаций чаще всего являются нарушения структуры кодируемого геном белка, сопровождающиеся изменениями уровня активности или его количественного содержания (вплоть до отсутствия), то данные мутации можно рассматривать в качестве моделей для поиска соединений, проявляющих свойства агонистов/антагонистов в отношении поврежденного белка.

К наиболее полно клинически и генетически охарактеризованным моногенным патологиям относятся: фенилкетонурия, муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна/Беккера, синдром ломкой Х-хромосомы, спинальная мышечная атрофия, спиноцеребеллярная атаксия, нейрофиброматоз 2-го типа и др. На данный момент в базе данных OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) имеются сведения о более чем 16000 генах, патологические мутации в которых обуславливают развитие моногенных заболеваний [https://www.omim.org/]. Отметим, что изучение генов и белков, функция которых изменяется при моногенных заболеваниях, определило понимание молекулярного патогенеза и некоторых мультифакторных патологий, поскольку оказалось, что одни и те же полиморфные варианты генов вовлекаются как в редкие семейные формы, так и ассоциируются с генетически обусловленными мультифакториальными заболеваниями. В таблице 1 приведены сведения, иллюстрирующие некоторые подобные примеры (цитируется по Peltonen et al. (2006)).

Таблица 1. Примеры менделевских признаков, обуславливающих отдельные механизмы патогенеза генетически детерминированных мультифакториальных заболеваний

Мультифакториальное заболевание	**Соответствующее моногенное заболевание**	**Патогенетически значимые мутантные гены**	**Предполагаемое значение для патогенеза мультифакториального заболевания**
Психические заболевания	Семейные формы аутизма, редкие синдромы с транслокациями	Robo1, FOXP2, DISC1, neuroligins	Функция белков установлена в соответствующих клеточных моделях
Болезнь Альцгеймера	Семейные формы с ранним дебютом	Пресенилины, APP	Расшифрованы механизмы формирования амилоидных бляшек
Эпилепсия	Семейные формы эпилепсии	Ионные каналы, такие как SCN1A, SCN1B, KCNQ2, KCNQ3	Подтверждено значения нарушений функций ионных каналов для патогенеза эпилепсий
Головные боли	Семейная гемиплегическая мигрень	Ионные каналы, такие как CACNA1A, SCN1A, ATP1A2	Подтверждено значение дисфункции ионных каналов нейронов для патогенеза некоторых типов головной боли
Сердечные аритмии	Синдром удлиненного интервала QT	Ионные каналы, такие как KCNQ1, HERG, SCN5A, KCNE1, KCNE2	Предложена гипотеза этиологии и патогенеза внезапной сердечной смерти
Дислипидемии	Болезнь Танжера, семейные гиперлипидемии, гипо-альфа-холестеринемия	Белок-транспортер ABCA1, USF1 рецептор LDL APOB, ApoA1, LCAT, ABCG5, ABCG8, ARH	Получены новые данные о метаболизме холестерина
Гипертоническая болезнь/гипотония	Редкие семейные формы гипертензии (синдром Лиддла) или гипотонии (синдром Барттера, синдром Гительмана)	Ионные каналы (SCNN1G), белки, ассоциированные с процессами регуляции водно-солевого баланса; рецепторы минералкортикоидов	Получены новые данные о патофизиологии гипер- и гипотензии и механизмах поддержания физиологического уровня АД
Ожирение	Врожденный дефицит лептина; синдром Прадера–Вилли	Рецептор лептина, лептин, конвертаза 1-го типа, рецепторы меланокортинов 4-го типа	Установлено участие гормонов, синтезируемых в мозге и в жировой ткани, в патогенезе ожирения и метаболического синдрома
Диабет 2-го типа	Редкие семейные формы, MODY-диабет	Фактор транскрипции HNF1A, который регулирует экспрессию генов, связанных с липидным и углеводным обменом, синтезом белков острой фазы воспаления	Раскрыт один их механизмов, обуславливающих дисфункцию β-клеток

Более того, многие лекарственные препараты, разработанные для лечения распространенных наследственно-обусловленных заболеваний, оказались эффективными при терапии моногенных патологий, так как воздействуют на такие же вовлеченные в патогенез мишени, механизмы и метаболические пути (таблица 2, цитируется по Brinkman et al. (2006)).

Таблица 2. Моногенные заболевания и белки-мишени известных лекарственных препаратов

Лекарственный препарат (МНН)	**Мишень/ Тип действия**	**Заболевание, для которого разработан лекарственный препарат**	**Моногенное заболевание/ Мутантный ген**	**Фенотип при моногенном заболевании**
Амлодипин Нифедипин	Блокаторы медленных Ca^{2+}-каналов L-типа	Гипертензия, аритмия	Синдром Тимоти (CACNA1C)	Аритмия вследствие утраты функций ионного канала CACNA1C
Кветиапин Оланзапин Рисперидон	Антагонисты рецепторов дофамина D_2	Шизофрения, биполярное расстройство	Миоклоническая дистония (DRD2)	Психиатрические симптомы вследствие утраты функций рецептора дофамина DRD2
Конъюгированные эстрогены Ралоксифен	Агонисты рецепторов эстрогенов	Остеопороз, рак молочной железы, менопауза	Резистентность к эстрогенам (FSR1)	Ранний атеросклероз, остеопения вследствие утраты функций рецепторов эстрогенов FSR1
Эноксапарин натрия	Антагонист фактора свертывания Xa	Тромбозы	Дефицит фактора X (F10)	Коагулопатии вследствие утраты функций фактора X
Будесонид Флутиказона пропионат	Агонисты глюкокор-тикоидных рецепторов	Бронхиальная астма	Резистентность к глюкокортикоидам (GCCR)	Артериальная гипертензия вследствие утраты функций рецепторов глюкокор-тикоидов GCCR
Рекомбинантный инсулин	Агонист рецепторов инсулина	Инсулино-зависимый диабет 1-го типа	MODY-диабет, Синдром Донохью (INSR)	Задержки роста, нарушения метаболизма глюкозы вследствие утраты функций рецепторов инсулина INSR
Клопидогрел	Антагонист пуриновых рецепторов P2Y	Атеросклероз, инсульт	Врожденная коагулопатия (P2RY12)	Коагулопатии вследствие утраты функции пуриновых рецепторов P2Y
Орлистат	Ингибитор желудочно-кишечных липаз	Ожирение	Врожденная недостаточность ферментов поджелудочной железы (PNLIP)	Снижение утилизации пищевых жиров вследствие утраты функций липаз
Статины (Аторвастатин, Симвастатин, Ловастатин)	Ингибиторы 3-гидрокси-3-метил-глютарил-коэнзимаА редуктазы (ГМГ-КоА редуктаза)	Гипер-холестеринемия	Семейная гипер-холестеринемия (LDLR)	Повышенный уровень холестерина вследствие утраты функции рецептора ЛНП

Продолжение таблицы 2

Лекарственный препарат (МНН)	Мишень/ Тип действия	Заболевание, для которого разработан лекарственный препарат	Моногенное заболевание/ Мутантный ген	Фенотип при моногенном заболевании
Сульфонилмочевины (Глибенкламид, Глипизид)	Антагонисты рецептора сульфонил мочевины 1 SUR1 β-клеток поджелудочной железы	Диабет 2-го типа	Диабет новорожденных. Врожденный гиперинсулинизм (ABCC8, KCNJ11)	Острая гипогликемия вследствие утраты функции рецептора SUR1. Диабет вследствие усиления функции рецептора SUR1
Рекомбинантный эритропоэтин	Агонист рецепторов эритропоэтина	Анемия	Семейный эритроцитоз (EPOR)	Увеличенное содержание эритроцитов вследствие усиления функции рецептора эритропоэтина
Абциксимаб	Блокатор гликопротеиновых GP IIb/IIIa рецепторов мембран тромбоцитов	Неотложные состояния, вследствие патологии сердечно-сосудистой системы	Тромбастения. Гланцмана (ITGA2B, ITGB3)	Различные патологии, связанные с повышенным риском внутренних кровотечений вследствие утраты функции GP IIb/IIIa рецепторов

Как было отмечено выше, определяющим этапом разработки новых средства фармакотерапии распространенных заболеваний является выявление причин заболевания и поиск путей, направленных на коррекцию патологии. Обзор имеющихся в литературе данных свидетельствует о том, что лечение генетических заболеваний может проводиться на уровне дефектного гена или генов (генная и хромосомная терапия), замены аномального белка (трансплантация гемопоэтических клеток), модификации метаболического каскада (специальные препараты, терапия, снижающая содержание субстрата) и симптоматической терапии.

Генная терапия – это лечение моногенных, мультифакториальных заболеваний путем введения генов в соматические клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых свойств. Данная технология начала развиваться в 1972 г. в США, и к настоящему времени в мире проведено 2300 клинических испытаний по генной терапии широкого спектра заболеваний. По данным литературных источников, на данный момент существуют более или менее эффективные подходы к генной терапии свыше 50 генетически детерминированных заболеваний человека: первичных комбинированных иммунодефицитов, гемофилии, гемоглобинопатий, кистозного фиброза, ахроматопсии, амавроза Лебера, эпилепсии, остеоартрита, болезни Паркинсона, онкологических заболеваний.

Важнейшими условиями генотерапии является выбор наиболее эффективного для лечения гена, который определяется патогенетическими механизмами развития заболевания, способов его доставки в клетки и поиск эффективных

способов регуляции экспрессии данного гена и его продолжительности. С целью обеспечения эффективной работы терапевтического гена, как правило, модифицируют структуру его регуляторной области путем введения тканеспецифических промоторов и энхансеров. Существует большой спектр методов защиты гена-корректора от деградации эндогенными нуклеазами. Наиболее часто применяются упаковка их в нанонастицы или в липосомы, создание специальных векторов вирусной или невирусной природы. Разнообразны также методы доставки терапевтического гена: прямая инъекция «голой» ДНК, электропорация клеток, доставка через поры мембран, бомбардировка клеток с частицами ДНК с использованием аэродинамической пушки и др.

В генотерапии используются следующие вирусы: аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и ретровирусы. Предпочтение отдается аденоассоциированным вирусам, так как они обладают большей способностью инфицировать различные ткани и вызывают меньшую воспалительную реакцию. К настоящему времени FDA и EMA одобрены для клинического применения следующие генотерапевтические препараты на основе вирусов. *Alipogene tiparvovec-Glybera* – представляет собой аденоассоциированный вирус, используется при гиперлипопротеинемии типа 1, вызванной рецессивными вариантами гена *LPL*, которые приводят к дефициту липопротеинлипазы, вызывая гиперхиломикронемию и панкреатит. *Strimvelis* – препарат создан с использованием ретровируса в качестве вектора, он применяется при дефиците аденозиндезаминазы, который приводит к тяжелым комбинированным иммунодефицитам. *Zynteglo* – препарат создан с использованием лентивируса в качестве вектора и используется при терапии бета-талассемии, характеризующейся врожденной микроцитарной анемией, снижением гемоглобина А и повышением гемоглобина F, гепатоспленомегалией. *Voretigene neparvovec-rzyl – Luxturna*, препарат создан с использованием аденоассоциированного вируса в качестве вектора и используется при наличии в геноме рецессивных вариантов гена *RPE65*, которые вызывают врожденный амавроз Лебера и пигментный ретинит 20. *Onasemnogene abeparvovec-xioi-Zolgensma* – при спинальной мышечной атрофии 1 у детей с прогрессирующей врожденной гипотонией, при которой у большинства пациентов детектируется делеция в экзоне 7 гена *SMN1*.

Кроме способов, основанных на применении вирусов для доставки терапевтических генов в ткани, в последнее время стали интенсивно развиваться методы, направленные на нокаут дефектных генов. В настоящее время используется несколько способов нокаута генов, в частности использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). Как известно, антисмысловыми называются небольшие по протяженности олигонуклеотиды (обычно 22-24), комплементарные мРНК, способные создать двухцепочечную структуру и снизить уровень экспрессии или вообще блокировать трансляцию данной мРНК.

Следует отметить, что в данный момент известно три вида антисмысловых технологий: применение АСО, рибозимов и РНК-интерференция. Они позволяют подавить экспрессию генов на уровне транскрипции, трансляции, деаденилирования или деградации мРНК. Общей особенностью механизма действия этих структур является то, что антисмысловой эффект наступает только после взаимодействия с РНК-мишенью.

Еще один вид антисмысловых технологий основан на использовании малых интерферирующих РНК (siRNA), действующих на основе принципа РНК-интерференции. По сравнению с АСО и рибозимами siRNA имеют ряд преимуществ, которые заключаются в высокой специфичности действия и эффективности снижения экспрессии генов. К сожалению, применение малых интерферирующих РНК сопряжено с определенными сложностями, в частности быстрой деградацией под действием РНКаз и ограничениями транспорта в клетки. Следует отметить, что применение рибозимов в генотерапевтических технологиях не нашло широкого применения из-за их нестабильности в плазме крови.

По имеющимся в литературе данным, на 2020 г. зарегистрировано 10 препаратов, созданных на основе антисмысловых технологий: фомивирсен (ЦМВ-индуцированный ретинит), мипомирсен (семейная гиперхолестеринемия), этилперсен, голодирсен, вилтоларсен (мышечная дистрофия Дюшена), гивосиран (острые порфирии печени), воланесорсен (гипертриглицидемия, синдром семейной хиломикронемии и семейная частичная липодистрофия), патисиран, инотерсен (наследственный транстиретиновый амилоидоз) и нусинерсен (спинальная мышечная атрофия I, II, III типов).

Большие возможности для генотерапии открываются при использовании современных технологий геномного редактирования. На сегодняшний день наиболее перспективными являются подходы, основанные на использовании искусственных (гибридных, или «дизайнерских») сайт-специфичных нуклеаз: ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9. В общем случае каждая из перечисленных технологий редактирования генома включает три компонента: специфичный к последовательности ДНК «наводчик» (указывающий, где резать), разрезающие ДНК «ножницы» (эндонуклеазу) и собственно привносимую последовательность ДНК (нужна не всегда). В системе CRISPR/Cas9 механизм наведения нуклеазы на цель принципиально отличается от системы TALEN. Дело в том, что в системе CRISPR/Cas9 в качестве «наводчика» используют не белковые домены, а молекулу РНК (single guide RNA, sgRNA) длиной около 40 нуклеотидов, состоящую из двух частей: собственно наводящей crRNA и адаптерной (трансактивационной) tracrRNA. С точки зрения исследователей, работающих в области геномной медицины, система CRISPR/Cas9 выглядит наиболее перспективным инструментом редактирования генома, поскольку она универсальна, довольно проста в исполнении и обладает высокой сайт-специфичностью. У метода сразу несколько важных достоинств: универсальность способа наведения нуклеазы; отсутствие потребности в генно-инженерной сборке фермента – меняется только наводящая РНК; способность нуклеазы Cas9 резать обе цепи ДНК; возможность встроить «генетическую заплатку» в наводящую РНК. Недостаток метода – потенциальная иммуногенность чужеродного белка. Ниже приводится неполный перечень заболеваний, для лечения которых используют геномное редактирование на основе дизайнерских нуклеаз: наследственные заболевания глаз, гемоглобинопатии, мышечные дистрофии, онкология, ВИЧ, вирус гепатита В, и др.

Не вызывает сомнений, что генетические методы будут иметь большое значение для познания механизмов патогенеза заболеваний и создания принципиально новых лечебных препаратов.

3.3. Рациональное применение лекарств

Сопряжение клинической физиологии и фармакологии прослеживается и при использовании лекарств.

На физиологических, клинико-физиологических данных основан анализ сотен биохимических показателей в биологических субстратах человека, инструментальных исследований. Клинико-физиологические оценки необходимы как для диагностики, так и выбора лекарственного средства, способа его применения.

Пример. Изучение роли ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в формировании артериальной гипертензии. Фундаментальные исследования показали, что синтезируемый юкстагломерулярным аппаратом почек протеолитический фермент ренин с током крови достигает печени, где под его воздействием ангиотензиноген превращается в биологически неактивный ангиотензин I. Последний, в свою очередь, под влиянием АПФ превращается в активный ангиотензин II, который, связываясь со специфическими AT_1 рецепторами, расположенными на мембране гладко-мышечных клеток сосудов, вызывает вазоконстрикцию. В клиническую практику в качестве антигипертензивных средств внедрены лекарства, воздействующие на разные звенья процесса. Прямые ингибиторы ренина – алискирен, ингибиторы АПФ – периндоприл, рамиприл и др., блокаторы АТ1 рецепторов – лозартан, ирбесартан и др.

Клинико-физиологические исследования показали, что все препараты снижают АД, однако конечная эффективность и побочные действия зависят от уровня блокады каскада. Ингибирование ренина не влияет на показатели основных сердечно-сосудистых исходов. Ингибирование АПФ у 10-30% пациентов сопровождается кашлем, ангионевротическим отеком. В то время как блокаторы AT_1 рецепторов при сходстве по эффективности с ингибиторами АПФ не вызывают побочных действий, требующих ургентной терапии и/или отмены препарата.

Обратный пример, когда фармакологически выявляется критический физиологический признак – недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

В конце 40-х годов Alf Alving апробировал противомалярийный препарат примахин на солдатах американской армии. Оказалось, что у некоторых мужчин африканского происхождения примахин вызывал гемолиз эритроцитов. Деструктивный эффект зависел от недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Генетический дефект сцеплен с Х хромосомой. Аномальная форма фермента – одна из самых распространенных энзимопатий на Земле, особенно в Средиземноморье, на Кавказе. Практический результат – разработка и широкое распространение тестов на фермент для предикции побочных действий лекарств с окислительными свойствами.

Другие известные феномены – полиморфизм ацетилирования, окисления, атипичная бутирилхолинэстераза – представляются общей проблемой клинической физиологии и фармакологии. Основная цель, преследуемая при ее решении, – тестирование пациента по признаку перед назначением лекарства.

В клинической физиологии имеется понятие фармакологической пробы. Исторически первая фармакологическая проба с атропином была предложена в 1892 году отечественным терапевтом К.К. Дегио с целью дифференциальной диагностики брадикардии. В настоящее время проба успешно используется

в дифференциальной диагностике синдрома слабости синусового узла. В основе – способность атропина блокировать М2 холинорецепторы холинэргических синапсов на мембране пейсмекерных клеток преимущественно синоатриального узла, что нивелирует тормозное действие парасимпатического отдела вегетативной нервной системы и инициирует развитие положительного хронотропного ответа, а на ЭЭГ реализуется в укороченном интервале R-R.

Хорошую перспективу имеет разрабатываемая в ОФ РАН концепция фармакологической пробы для доклинической диагностики болезни Паркинсона. Ее внедрение поможет оптимизировать фармакотерапию заболевания, своевременно применить нейропротекторные препараты для защиты дофаминергических нейронов.

3.4. Изыскание новых фармакологических препаратов

Как упоминалось выше, открытие эндогенных физиологически активных соединений и их клинического значения является источником идей для формулировки гипотезы лекарственного средства.

Некоторые вещества можно использовать для заместительной терапии, однако предпочтительна модификация структуры с сохранением и/или оптимизацией эффекта, поскольку эндогенные соединения легко метаболизируются, имеют неудовлетворительные фармакокинетические параметры, вследствие чего фармакологически непригодны. К моменту регистрации в первой половине 20 века основных физиологически активных веществ, гормонов, медиаторов уже возник потенциал органической химии. Вопреки Берцелиусу, по которому «все органические вещества получаются под действием жизненной силы», немецкий химик Вёлер в 1824 году из вещества минеральной природы дициана получил щавелевую кислоту, а в 1828 году из циано-кислого аммония – мочевину. В 1861 году Бутлеров синтезировал сахаристые вещества и создал теорию строения органических соединений.

Одним из первых лекарственных препаратов стал хлораль, полученный при хлорировании этанола, применявшийся в качестве седативного средства.

Таким образом, новый комплекс фармакологических решений возник в результате физиологических открытий и становления органической химии.

В аспекте настоящей статьи уместно уточнить понятие фармакология и фармация. Фармакологические исследования направлены на выяснение механизмов взаимодействия экзогенного вещества с организмом, изучение его фармакодинамики и фармакокинетики. В фармации исходно ставилась задача изготовления лекарства. На современном этапе в эту область входит весь комплекс превращения активного соединения в конечную лекарственную форму. Области, безусловно, перекрываются, но различия очевидны.

В отечественной фармакотерапии присутствуют лекарства – экстракты из различных биологических субстратов. Например, церебролизин, актовегин, кортексин, лаеннек и др. Регулярно возникают новые предложения. С позиции фармакологии и клинической физиологии для таких препаратов необходимо решение вопросов стандартизации, дозирования, фармакокинетического контроля и патогенетически обоснованных показаний к назначению.

3.5. Фармакологические стимулы в развитии клинической физиологии

Имеются примеры, когда лекарственные препараты либо на основе природных источников, иногда случайно выявленные, обеспечивают понимание новых физиологических и клинико-физиологических механизмов.

Наиболее цитируемый – аспирин. Порошок коры ивы как жаропонижающее средство известен с давних времен. В 19 веке из коры ивы выделили салицин, гидролизом которого получена салициловая кислота. В 1953 году Ч. Герхардт нейтрализовал салициловую кислоту смесью салицилата натрия и ацетилхлорида и получил ацетил-салициловую кислоту – аспирин. После многолетних исследований выявлено, что аспирин снижает синтез простагландинов за счет ингибиции фермента циклооксигеназы-2. Таким образом, изучение аспирина дополнило представления о физиологических механизмах воспаления, что, в свою очередь, стало основой создания нового класса лекарственных средств – нестероидных противовоспалительных препаратов.

Одним из самых ярких примеров влияния фармакологии на клиническую физиологию рассматривается трансформация психиатрии на рубеже 50-х годов прошлого века.

В 1883 г. Бернтсеном было синтезировано основное ядро фенотиазина, соединение пытались внедрить в качестве противоглистного средства. Однако ожидаемого противопротозойного действия не выявили. В начале 1940 г. Анри Лаборит, хирург французского военно-морского госпиталя, обнаружил, что производное фенотиазина прометазин, позиционировавшееся как противогистаминное, оказалось полезным для предотвращения хирургического шока. Препарат вызывал «эйфорическое спокойствие» с «состоянием безразличия», а при введении до операции пациенты оставались «спокойными, несколько сонными и расслабленными». Лаборит испробовал препарат для анестезии и ослабления беспокойства пациентов. А в 1957 г. препарат хлорпромазин был применен в психиатрическом госпитале в Париже. В том же году появился ряд отчетов и статей во Франции и в Италии, в период 1953–1955 гг. хлорпромазин распространился во всех психиатрических клиниках мира. Появление первого нейролептика преобразило психиатрическую клинику и дало старт новой науке психофармакологии. Было установлено, что хлорпромазин является антагонистом $Д_2$ рецептора, что стимулировало развитие дофаминовой гипотезы шизофрении. Многие поколения последовавших психотропных средств, нейролептиков, антидепрессантов обеспечили выяснение роли других нейрохимических систем в психиатрической патологии.

Еще один пример влияния фармакологии на физиологию. В начале 1950 г. Лео Штернбах из исследовательского центра Hoffmann La Roche (США) синтезировал несколько соединений гептоксидина для создания красителей. На фоне всплеска эмоций, связанных с успехом хлорпромазина, он стал искать в ряду соединения с психотропными свойствами. Опыты не дали результатов. Штернбах решил стабилизировать один из бензоксадиазепинов метиламином, вместо использования вторичных или третичных аминов. Стабилизированное соединение под шифром R05-0690 оказалось на полке. В 1957 г. во время лабораторной чистки R05-0690 был найден и передан

на фармакологическое исследование, в которых была обнаружена активность, сходная с мепробаматом.

В 1960 г. R05-0690 – первый транквилизатор безнодизепинового ряда был внедрен в медицинскую практику под названием Librium. В 1963 г. появился следующий препарат – диазепам. Введение в лекарственный оборот бензодиазепинов значительно расширило возможности психофармакотерапии, начиная от шизофрении, депрессии и биполярных расстройств, до облегчения тревоги и невротических расстройств. До середины 80-х годов бензодиазепиновые транквилизаторы были самыми распространенными в мире лекарственными средствами. Успешно, но по уточненным показаниям, препараты применяются и в настоящее время.

Бензодиазепины имели большое значение для физиологической науки. В 1976 г. был открыт безнодиазепиновый рецептор, впоследствии установлено, что лигандное связывание бензодиазепинов, приводящее к анксиолитическому и седативному действию, происходит на специфическом участке $ГАМК_A$ рецептора. Лигандное связывание усиливает ГАМК трансмиссию, что было впервые установлено В.В. Закусовым и Р.У. Островской, в результате увеличивается ток ионов хлора в клетку. Изучение молекулярных механизмов действия бензодиазепинов показало возможность аллостерической регуляции $ГАМК_A$ рецептора.

Примеры с аспирином, хлорпромазином и бензодиазепинами дополнительно иллюстрируют взаимосвязь фармакологии и физиологии. Более того, в современной физиологии, клинической физиологии применение лекарств с известным механизмом действия, соединений – фармакологических анализаторов с установленными фенотипом эффекта, является незаменимым инструментом научного поиска.

4. Заключение

Материал статьи, по сути, обсуждает вопросы, которых практически не существовало при становлении современной отечественной физиологии и фармакологии. Уместно привести несколько цитат из статьи Давида Абрамовича Каменского (1858–1938), опубликованной в 1904 году, «Иван Петрович Павлов как профессор фармакологии».

«В 1890 г. Иван Петрович, будучи доцентом физиологии, выступил кандидатом на освободившуюся в Академии кафедру фармакологии, на которую значительным большинством голосов был избран в апреле того же года».

«Для лиц же, близко знакомых с деятельностью Ивана Петровича в лаборатории покойного профессора С.П. Боткина, как и для большинства членов конференции, не подлежало никакому сомнению, что именно Ивану Петровичу, помимо прирожденного преподавательского таланта, уже имевшему за собою обширный лабораторный опыт в деле разработки специальных фармакологических вопросов, не только легко будет справиться со всеми применявшимися в то время способами исследования в фармакологии, но что он окажется в состоянии значительно расширить применение физиологических методов к решению различных фармакологических задач. Для многих членов Конференции не могло оставаться неизвестным,

что вышедшие из клиники проф. С.П. Боткина работы о действии Adonis vernalis, Convallaria majalis, строфанта антипирина, цезия и рубидия, наряду с некоторыми другими исследованиями, все в своей экспериментальной части были разработаны с помощью Ивана Петровича, притом с такими подробностями, которые едва ли могли быть выполнены даже заправскими фармакологами».

«Выкинув из курса несущественные мелочные подробности, Иван Петрович сумел также распределить более отчетливо фармакологический материал, расположив, как специалист физиолог, все вещества по их физиологическим свойствам».

«Слушатели сразу увидели, что фармакологический материал можно распределить на средства, возбуждающие и парализующие нервные центры, те или другие периферические нервные окончания, на возбуждающиеся и парализующиеся мышцы, различные секреторные органы и т. д.».

Д.А. Каменский описывает, с какой тщательностью И.П. Павлов подходил к опытам, демонстрирующим эффекты фармакологических средств, как это воспринимали слушатели, часто награждавшие профессора аплодисментами.

За 5 лет руководства кафедрой фармакологии И.П. Павлов преобразил преподавание предмета, наполнив его физиологическими знаниями.

В научных исследованиях И.П. Павлов полагал, что «гораздо более важно изучить в деталях подробности механизма действия уже испытанных препаратов, чем стремиться к фармакологическому исследованию огромного количества новых медикаментов».

На идеях И.П. Павлова был выполнен ряд диссертаций с изучением хлористого аммония, наркотических средств, эметина, атропина, камфоры, теобромина, бром-этила и др.

Известными фармакологами стали ученики И.П. Павлова – В.В. Савич, И.С. Цитович, цитируемый в статье Д.А. Каменский и др. В 1899 г. вскоре после перехода И.П. Павлова в Институт экспериментальной медицины, кафедру фармакологии военно-медицинской академии возглавил Н.П. Кравков, создавший основы современной отечественной фармакологии. Из школы Н.П. Кравкова вышли С.В. Аничков, В.В. Закусов, М.П. Николаев и др., в трудах которых значимость фармакологических результатов трудно отделить от физиологических.

Неслучайно академики С.В. Аничков и В.В. Закусов были удостоены Ленинской премии в 1976 г. «За выдающиеся исследования в области нейрофармакологии и создание теории действия средств, влияющих на центральную нервную систему».

Таким образом, совместное развитие фармакологии, физиологии и клинической фармакологии прослеживается со времен появления письменности. Очевидны взаимосвязь, взаимообогащение и невозможность раздельного существования.

Поэтому не вызывает сомнений фундаментальность решения, принятого академиком РАН Ю.В. Наточиным, об объединении специалистов физиологов, клинических физиологов и фармакологов в отделении физиологии Российской академии наук.

Глава 11. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

В.А. Ткачук

Регенерация – это гомеостатический процесс, который поддерживает или воспроизводит исходную структуру и функцию ткани. Хотя все организмы регенерируют, степени возможной регенерации варьируют между видами, в зависимости от уровня их биологической организации (рис.1).

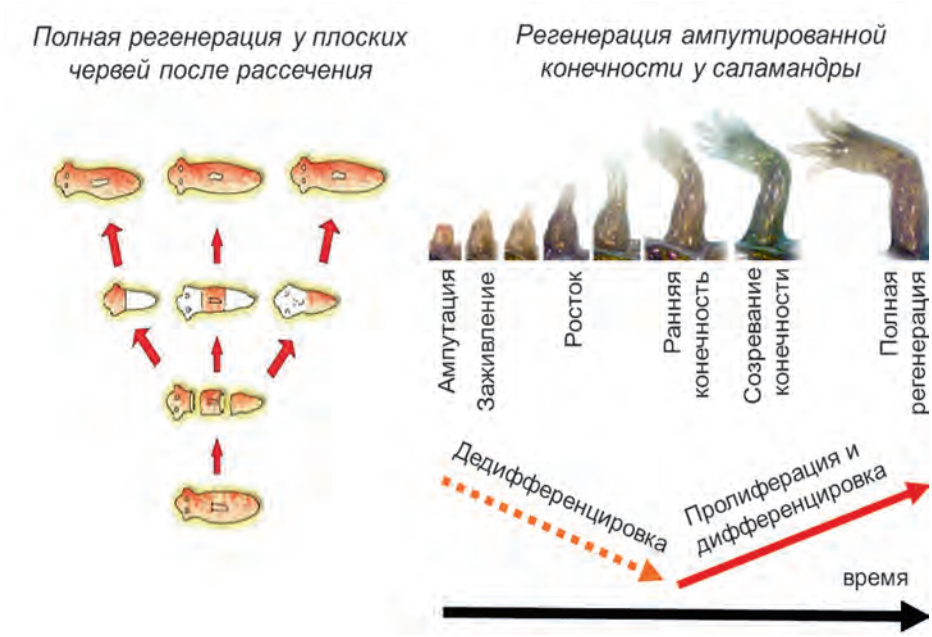

Рисунок 1. Примеры регенерации в живой природе

У животных и человека в течение всей жизни происходит обновление клеток во всех органах и тканях. Так, например, у человека печень обновляется каждый год, а скелетная система – раз в десять лет. Данный тип регенерации, основанный на замене клеток в здоровой ткани, можно назвать физиологической регенерацией. Однако массивная потеря клеток, вызванная травмой или заболеванием (т. е. потерей ткани), вызывает гораздо более интенсивное восстановление отсутствующей ткани. Такой ответ можно назвать репаративной регенерацией. Обе эти формы регенерации участвуют в поддержании гомеостаза клеток в тканях. У позвоночных животных помимо регенерации может происходить фиброз, при котором поврежденные ткани наводняются фибробластами, которые не восстанавливают первоначальную архитектуру ткани, но заделывают пострадавший участок коллагеновой рубцовой тканью.

Ричард Дж. Госс дал следующее философское определение регенеративному процессу: «Если бы не было регенерации, то не могло бы быть и жизни. Если бы все в мире регенерировало, то не было бы смерти. Все организмы существуют между этими двумя полюсами. При прочих равных они стремятся ко второму полюсу, никогда не достигая истинного бессмертия, поскольку оно было бы несовместимо с размножением» [1].

Механизмы регенерации у позвоночных

Механизмы регенерации в разных тканях различаются. Регенерация может происходить даже за счет восстановления структуры клеток. Если произошла утрата цитоплазматической части клетки, то ее последующее восстановление может происходить путем повторного роста внутриклеточных структур из остатка этой клетки. Такая регенерация наблюдается в тканях позвоночных, когда удлиненные клетки или их отростки участвуют в формировании ткани. Например, в скелетных мышцах миофибриллы после рассечений регенерируют путем закрытия мембран своих обрезанных отростков и продолжающимся образованием новых миофибрилл, восстанавливающих исходную структуру клетки путем слияния мембран двух фрагментов клетки. В нервной ткани после рассечения аксонов регенерация происходит за счет того, что часть отрезанного аксона, которая сохранила связь с нервной клеткой, снова прорастает к своей ткани-мишени [2].

Регенерация из предсуществующих дифференцированных родительских клеток может включать три различных механизма: компенсаторную пролиферацию дифференцированных клеток, эпителиально-мезенхимальную трансформацию или мезенхимально-эпителиальную трансформацию, а также дедифференцировку или редифференцировку.

Компенсаторная пролиферация – это деление клеток при поддержании их дифференцированной структуры и функции. Классическим примером является регенерация печени [3]. После частичной гепатэктомии гепатоциты и непаренхиматозные клетки печени делятся, продолжая при этом выполнять свои основные функции по регуляции уровня глюкозы, синтеза белков крови, секреции желчи и метаболизма лекарств, до тех пор, пока не будет восстановлена исходная масса печени. По такому же механизму регенерируют и клетки других типов, например β-клетки поджелудочной железы и эндотелиальные клетки кровеносных сосудов.

Эпителиальные и мезенхимальные клетки могут трансформироваться друг в друга. Это явление, называемое эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) и мезенхимально-эпителиальным переходом (МЭП), занимает видное место среди механизмов эмбриогенеза и при патологических процессах, например, фиброзе и канцерогенезе [4]. При ЭМП эпителиальные клетки приобретают способность мигрировать, в то время как МЭП ограничивает миграцию и способствует построению эпителия. В эмбриогенезе во время морфогенетических перемещений происходит трансформация эпителиальных клеток в мезенхимальные [5]. При канцерогенезе эпителиально-мезенхимальный переход приводит к метастазированию.

Дедифференцировка – это эпигенетическое перепрограммирование, приводящее к потере фенотипической специализации и возврату клеток к менее дифференцированному состоянию, которое позволяет им пролиферировать и редифференцироваться в исходный клеточный тип.

Трансдифференцировка – это обращение клеток одного типа в клетки другого типа, что происходит обычно путем дедифференцировки зрелой клетки, в результате чего повышается ее пластичность.

Постнатальные стволовые клетки (ПНСК) существуют в виде недифференцированных клеток, сохраняясь в тканях со времени эмбрионального развития в локальных нишах, поддерживающих их стволовые свойства. При активации стволовые клетки ниш могут претерпевать симметричное деление, давая начало двум стволовым клеткам, либо двум коммитированным клеткам, либо асимметрично, давая коммитированную и стволовую клетку [6] (рис. 2). Возникновение новой стволовой клетки в результате деления стволовых клеток называется самообновлением. ПНСК имеют различные степени потентности, в зависимости от обслуживаемой ими ткани. Некоторые являются мультипотентными и дают начало нескольким типам клеток, как например, при гемопоэзе, другие, например, эпидермальные клетки, унипотентны, они производят только кератиноциты. Активация ПНСК к дифференцировке может происходить как при физиологической, так и репаративной регенерации. При физиологической регенерации стволовые клетки претерпевают продолжительное, но медленное деление в ответ на сигналы от окружающей их среды, поддерживая постоянный приток новых клеток в новое микроокружение, направляющее их дифференцировку, а при повреждении стволовые клетки активируются и начинают быстро пролиферировать.

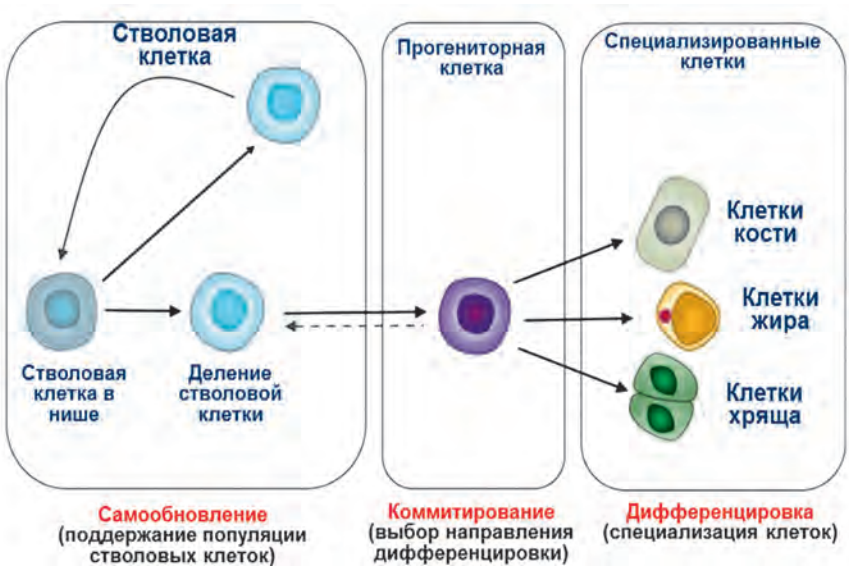

Рисунок 2. Самообновление, коммитирование и дифференцировка мезенхимных стволовых клеток

Эпителиальные стволовые клетки

Эпителий составляет до 60% всех дифференцированных тканей организма [7]. Он происходит из экто- и эндодермального зародышевых листков гаструлы. Эпителиальные клетки скреплены друг с другом и с базальной мембраной посредством специализированных межклеточных контактов. Основные межклеточные белки, характерные для этих клеток, – кератины. Эпителиальные клетки образуют эпидермис кожи, выстилают полости органов, которые формируют пищеварительную и дыхательную системы, урогенитальный тракт и центральную нервную систему. Гепатоциты печени, ацинарные клетки поджелудочной железы и ассоциированные с ними канальцы также состоят из эпителиальных клеток. В кровеносных сосудах внутреннее пространство выстлано специализированными сосудистыми эпителиальными клетками.

Эндотелиальные клетки регенерируют с участием стволовых клеток, находящихся в костном мозге и в кровотоке, а также с помощью тех клеток эндотелия, которые имеют регенеративный потенциал.

Мезенхимальные стволовые клетки

Оставшиеся ткани тела происходят из мезодермального и эктомезодермального (нервный гребень) слоев гаструлы и нейрулы. Сюда входят ткани опорно-двигательного аппарата, сердечной мышцы, гладкой мускулатуры, дермы, а также рыхлой соединительной ткани, связанной с этими тканями. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), изначально выделенные из костного мозга Фриденштейном и соавт. [7], способны к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, хондробласты, а также клетки скелетных и гладких мышц [8] (рис. 3). Есть свидетельства того, что бóльшая часть МСК на самом деле может представлять собой периваскулярные перициты, что объяснило бы их обнаружение в широком круге тканей [39].

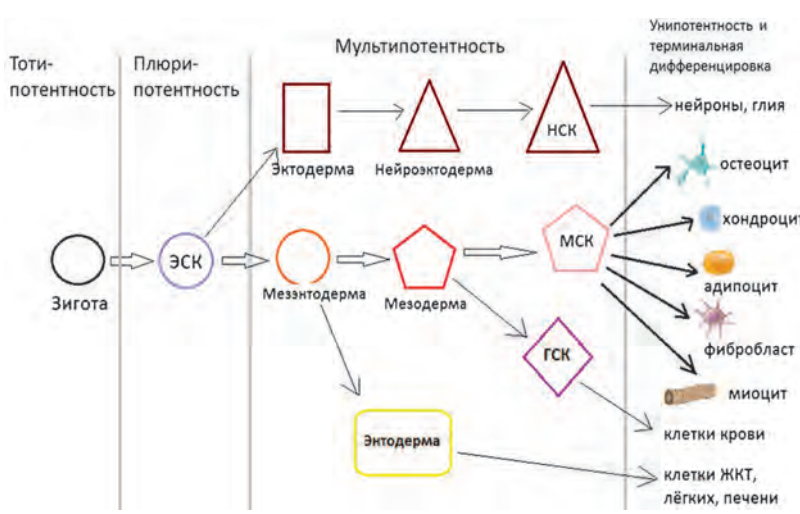

Рисунок 3. Дифференцировка стволовых клеток в эмбриогенезе

Концепция ниши в восстановлении тканей

Стволовые клетки всех тканей пребывают в микроокружениях (нишах), состоящих из внеклеточного матрикса (ВКМ) и разнообразных растворимых молекул, некоторые из которых синтезируются местными тканями, а другие поступают с кровотоком.

Паракринные сигналы, влияющие на стволовые клетки, можно сгруппировать в четыре семейства на основе их структуры. Это семейство фактора роста фибробластов (FGF), семейство Hedgehog, семейство Wnt, и суперсемейство TGF-β, состоящее из семейства TGF-β, семейства костных морфогенетических белков (BMP), белков Nodal, семейства Vg1 и некоторых других белков [5]. Аутокринный сигнал действует на рецепторы производящей его клетки. Передача юкстакринных сигналов включает контакт между клетками, при котором лиганд на поверхности одной клетки присоединяется к рецептору на другой. Эндокринные лиганды циркулируют в крови и могут связываться с мембранными или ядерными рецепторами тканей-мишеней.

Адгезивные компоненты ВКМ передают сигналы, соединяясь с поверхностными клеточными рецепторами – интегринами [10]. К примеру, поддержание гемапоэтической стволовой клетки (ГСК) в состоянии покоя зависит от их связывания с остеобластами стромы костного мозга через N-кадгерин и фибронектин-связывающие интегрины (α4β1, α5β1) в адгезивном контакте [11]. Блокировка этой адгезии подавляет гемопоэз в культурах костного мозга. Механические свойства ВКМ, такие как пористость, жесткость, эластичность, растяжение и сжатие, играют важную роль в регуляции поведения клеток [12].

Региональные (взрослые) стволовые клетки, способные к дифференцировке во все или почти все типы клеток данной ткани, есть в большинстве органов и тканей, например в коже, кишечнике, головном мозге. Стволовые клетки каждой специализации имеют свои ниши, то есть набор факторов микроокружения, который обеспечивает как состояние покоя стволовой клетки, так и мобилизацию стволовых клеток к делению или дифференцировке.

Клетки внутренней массы бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) [14]. Благодаря своей способности к дифференцировке во все типы соматических клеток (свойство плюрипотентности) и неограниченному потенциалу деления ЭСК человека представляют собой уникальный объект для исследования раннего эмбрионального развития человека. С помощью ЭСК можно изучать процессы, происходящие в раннем онтогенезе, условия поддержания плюрипотентности, исследовать механизмы регуляции экспрессии генов.

Клетки, способные к дифференцировке во все типы тканей взрослого организма, существуют короткое время только в раннем эмбриогенезе, до стадии гаструляции, но происходящая с ними дифференцировка – процесс обратимый.

Разработанная в 2006 году японскими учеными Такахаши и Яманака технология генетического репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния позволяет из легкодоступных соматических клеток взрослого организма, таких как, например, фибробласты кожи, получить в лабораторных условиях аутологичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые по своим свойствам аналогичны

ЭСК [13]. Для индукции плюрипотентности необходимо и достаточно эктопической экспрессии транскрипционных факторов Oct-4, Sox2, c-Myc и Klf4, и эта комбинация универсальна для любого типа диплоидных соматических клеток человека и животных. Комбинации других определенных транскрипционных факторов, а также разных типов микроРНК могут привести к так называемой трансдифференцировке, то есть дифференцировке одного типа клеток в другой (например, фибробластов – в нейроны, с помощью одного набора факторов, и в гепатоциты – с помощью другого) без прохождения клеток через плюрипотентное состояние.

Тем не менее обычные культуры клеток не способны воспроизвести трехмерную архитектуру ткани, представленной несколькими функционально активными типами клеток. Разработка протоколов трехмерной дифференцировки ЭСК и ИПСК в органоиды глаза, кишки, церебральные органоиды позволила получить модели, наиболее приближенные к нативным тканям человека. Эта технология основана на использовании способности дифференцирующихся ИПСК к самоорганизации.

Обычно под регенерацией понимают процесс заживления, поддерживающий или восстанавливающий исходную архитектуру ткани путем повторения части ее природного эмбрионального развития. Она отличается от фиброза, который замещает ткани рубцом. Основные механизмы регенерации – повторный рост клеток, размножение предсуществующих дифференцированных клеток, активация постнатальных стволовых клеток и трансдифференцировка. В большинстве тканей один из этих четырех механизмов используется в качестве основного пути регенерации, однако есть ткани, которые регенерируют для восстановления структуры по двум или даже трем механизмам.

Максимов
Александр Александрович
(1874–1928)

Фриденштейн
Александр Яковлевич
(1924–1997)

Рисунок 4. Ученые, открывшие гематопоэтические и мезенхимные стволовые клетки

Научные основы регенеративной биологии и медицины появились в XX веке (рис. 4). Александр Александрович Максимов в 1909 году высказал гипотезу о существовании в костном мозге гематопоэтической клетки, из которой образуются все клетки крови (рис. 5). Еще одним основоположником

этой науки можно назвать Александра Яковлевича Фриденштейна, который в 60-х годах прошлого века открыл мультипотентные мезенхимные стромальные стволовые клетки (МСК) (Friedenstein, 1968; Friedenstein, 1989), из которых образуются адипоциты, остеобласты, хондроциты и миоциты (рис. 3).

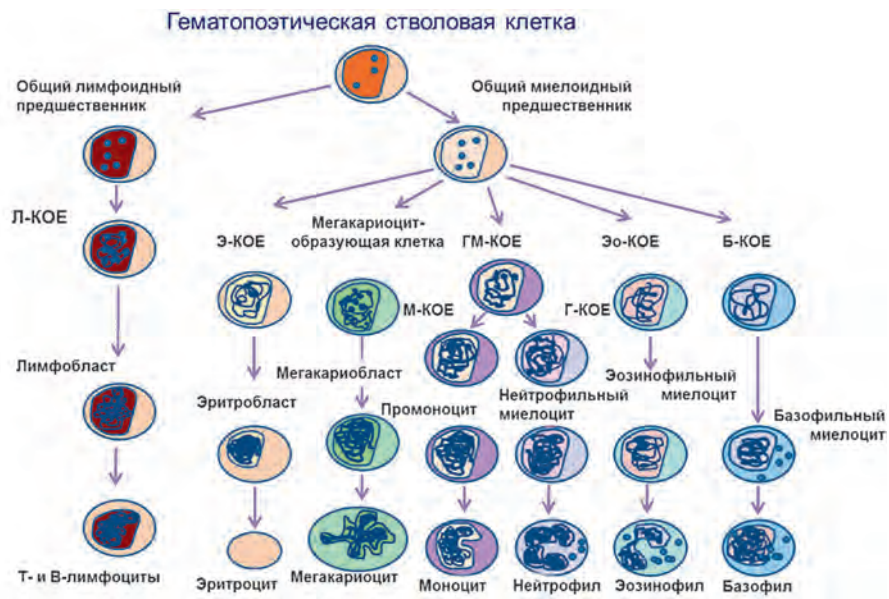

Рисунок 5. Кроветворение – процесс последовательной дифференцировки гематопоэтической стволовой клетки

В течение всей жизни многоклеточного организма идет обновление его клеток. За время жизни в теле человека образуются и погибают тонны клеток. Процессы обновления за счет стволовых клеток в некоторых тканях являются доминирующими и могут проходить очень интенсивно. Так, например, за время жизни человека из гематопоэтических клеток костного мозга, составляющего всего 1,5 кг ткани, в крови образуются три тонны клеток.

С возрастом и при некоторых заболеваниях у человека истощаются стволовые клетки, уменьшается как их число, так и регенеративный потенциал. Уже несколько десятилетий делаются попытки преодолеть это с помощью так называемой клеточной терапии. Появилась возможность выделять стволовые клетки, приумножать их вне организма и возвращать обратно. Но оказалось, что после этих процедур они погибают, не встраиваются в ткани. Обычно если терапевтический эффект наблюдался, то за счет секретируемых веществ, выделяемых введенными клетками до того, как они не погибли. По-видимому, основной причиной снижения регенеративного потенциала является старение ниши стволовых клеток. К этому заключению пришли в последние годы десятки лабораторий и клиник.

Как происходит старение клеток? Есть три важных процесса, которые в течение всей нашей жизни отмечают время. При каждом делении в клетке

на этапе репликации ДНК происходит 1-2 мутации. Это не слабость системы, это полезное для живого свойство, возникшее за миллионы лет эволюции живого, потому что мутация – это инструмент эволюции. Мы состоим из мозаики клеток, нет двух одинаковых. Кроме мутаций, в течение жизни накапливаются эпигенетические изменения в клетках, а также изменяется их микроокружение (рис.6).

Рисунок 6. Основные причины старения организма и механизмы замедления процессов обновления клеток

В нашем геноме закодированы структуры регуляторных молекул РНК, которые регулируют экспрессию генов, перепрограммирование клеток, их дедифференцировку и дифференцировку (рис. 7). При старении клеток происходят такие эпигенетические изменения хроматина, как степень ацетилирования и метилирования белков и ДНК, эти процессы регулируются микроРНК, длинными регуляторными РНК и факторами транскрипции.

Рисунок 7. Обновление клеток регулируют некодирующие РНК

Обновление и старение клеток происходят во всех органах и тканях, что изменяет их структуру и функции. Эволюция сформировала десятки механизмов гибели клеток, создав для этого специфические рецепторы и сигнальные пути, которые доводят сигналы гибели до специфических мишеней.

Здоровье и долголетие зависит от баланса между процессами гибели и образования клеток. Эти процессы взаимосвязаны, имеют прямые и обратные связи. Баланс между ними регулируется голодом, холодом, гипоксией и другими факторами (рис. 8). Так, например, голод запускает процессы аутофагии клеток, холод влияет на фолдинг белков, а гипоксия через рецептор кислорода регулирует апоптоз клеток. Через обратные связи эти внешние факторы стимулируют образование новых молодых клеток, их обновление, что продлевает время и эффективность работы разных функциональных систем.

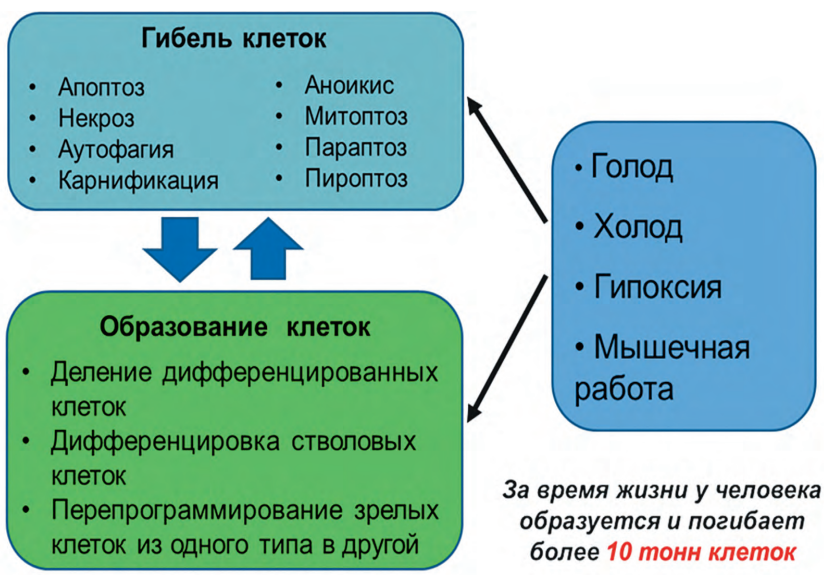

Рисунок 8. Здоровье и продолжительность жизни зависят от баланса между процессами гибели и образования клеток

Можно думать, что при экстремальных состояниях (голод, холод, гипоксия) первыми погибают состарившиеся (сенесцентные) клетки, а также те, в которых накоплены дефекты, возникающие под действием физических (радиация, ультрафиолет) или химических (токсические вещества) факторов. На смену погибшим из стволовых клеток образуются новые «молодые» клетки, не несущие этих дефектов, что способствует многолетнему поддержанию структуры и функции наших органов, а следовательно, и многолетнему функционированию организма.

Тело человека является «самообновляющейся машиной» с мощным потенциалом регенерации и репарации. В последние десятилетия появилась новая наука – регенеративная биомедицина, которая направлена на регуляцию процессов обновления клеток, а также восстановление органов и тканей.

Этой наукой обнаружены и идентифицированы специфические эндогенные регуляторы гибели и образования клеток, регенерации и репарации тканей. Это гормоны, цитокины, хемокины и факторы роста, а также регуляторные микро РНК. На эти процессы влияют многие факторы внешней среды, которые вызывают обновление клеток в нашем организме. Выяснение этих механизмов открывает широкие перспективы создания новых подходов к сохранению здоровья и продлению жизни человека.

Список литературы

1. *Goss, R.J.,* The natural history (and mystery) of regeneration., in A History of Regeneration Research, C.E. Dinsmore, Editor. 1991, Cambridge University Press: Cambridge,. p. 7–23.
2. *Yannas, I.V.,* Tissue and Organ Regeneration in Adults. 2001, New York: Springer.
3. *Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C.,* Liver regeneration. Science, 1997. 276: p. 60–66.
4. *Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A.,* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell, 2009. 139: p. 871–890.
5. *Gilbert, S.F.,* Developmental Biology. 9 ed. 2010, Sunderland: Sinauer Associates Inc.
6. *Morrison, S.J., Spradling, A.C.,* Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell, 2008. 132: p. 598–611.
7. *Friedenstein, A.J., Piatetzky II, S., Petrakova, K.V,* Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morph, 1966. 16: p. 381–390.
8. *Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., et al.,* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999. 284: p. 143–147.
9. *Caplan, A.I.,* Al MSCs are pericytes? Cell Stem Cell, 2008. 3: p. 229–230.
10. Hynes, R.O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell, 2002. 110: p. 673–687.
11. *Zhang, J.,* Niu Ye, L., Huang, H., et al., Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature, 2003. 425: p. 836–841.
12. *Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E.,* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell, 2006. 126: p. 677–689.
13. *Takahashi K., Yamanaka S.* Cell, 2006, 126(4)-663-76
14. *Thomson J.A. et al.* Science. 1998, 282-1145-1147
15. *Guilak, F., Cohen, D.M., Estes, B.T., et al.,* Control of cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. Cell Stem Cell, 2009. 5: p. 17–26.

Глава 12. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ

Диффузная нейроиммуноэндокринная система: сигнальные молекулы и их роль в клинической физиологии

М.А. Пальцев, И.М. Кветной

Ключевая роль и значение биологически активных веществ (сигнальных молекул), посредством которых клетки осуществляют коммуникационные взаимодействия, в формировании клинической физиологии была особо подчеркнута академиком А.А. Богомольцем в его определении нового биомедицинского научно-прикладного направления: «Клиническая физиология есть физиология больного человека, но она должна изучать и характер функционирования здоровых органов и систем этого же больного, и прежде всего роль и значение биологически активных веществ, в них вырабатываемых, в обеспечении компенсаторных реакций и резервных возможностей всего организма больного в целом» [1].

Нейроиммуноэндокринология: формирование концепции

В последние три десятилетия традиционные представления о механизмах поддержания гомеостаза организма претерпели революционные изменения. Выявление общего молекулярного «языка» для обмена сигнальной информацией между клетками, тканями и органами стерло привычные структурно-функциональные границы между тремя классическими регуляторными системами организма – нервной, эндокринной и иммунной. Все более актуальной и многообещающей проблемой современной биомедицины становится выяснение поликомпонентного и многоуровневого механизма единой нейроиммуноэндокринной регуляции физиологических функций, которой принадлежит роль универсального дирижера всех процессов жизнедеятельности [4, 11, 17].

Многочисленные исследования убедительно свидетельствуют о том, что различные клетки, принадлежащие к нервной, иммунной или эндокринной системам, синтезируют идентичные сигнальные молекулы – пептидные гормоны, биогенные амины, производные полиненасыщенных жирных кислот, а также другие биологически активные вещества – медиаторы межклеточных взаимодействий [7, 8].

Начало целенаправленным исследованиям в этом направлении положил английский патолог и гистохимик Александер Эверсон Пирс (A.E. Pearse) в конце 60-х годов XX века, когда он впервые предположил наличие в организме специализированной высокоорганизованной клеточной системы, основной функциональной характеристикой которой является выработка пептидных гормонов и биогенных аминов [20].

Pearse показал, что во многих органах присутствуют эндокринные клетки, обладающие общей способностью поглощать предшественники моноаминов (5-гидрокситриптофан, L-дигидроксифенилаланин) и декарбоксилировать их с последующим образованием биогенных аминов и пептидных гормонов. Эта способность отражена в предложенном им для обозначения этой серии клеток термине APUD – английской аббревиатуре словосочетания "Amine Precursor Uptake and Decarboxylation" [21].

В настоящее время APUD-серия включает более 100 типов эндокринных клеток, локализованных в желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе, мочеполовой системе, воздухоносном эпителии, пинеальной железе, щитовидной железе, надпочечниках, аденогипофизе и гипоталамусе, каротидном теле, коже, симпатических ганглиях, тимусе, плаценте, репродуктивной системе и других органах [17, 22].

В середине 70-х годов XX столетия разработка радиоиммунологических методов и быстрое развитие иммуногистохимии привели к открытию совершенно неожиданного феномена: одни и те же биогенные амины и пептидные гормоны, ранее идентифицированные в эндокринных клетках, были обнаружены и в нейронах. Это открытие было отмечено Нобелевской премией. Американский биохимик Роже Гиймен (R. Guillemin), получая ее в 1977 году, так и назвал свою Нобелевскую лекцию: «Пептиды в мозге: новая эндокринология нейрона».

Накопленные данные не укладывались в традиционную концепцию иерархии в двух главных регуляторных системах – нервной и эндокринной. Становилось все более очевидным, что механизм биологической регуляции основан на координированном функциональном взаимодействии между эндокринной и нервной (как центральной, так и периферической) системами, с общим типом восприятия и переноса информации на субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях.

Многочисленные исследования по идентификации одних и тех же (или аналогичных) физиологически активных веществ, действующих в нервной системе как нейротрансмиттеры, а в эндокринной системе – как гормоны, позволили объединить клетки APUD – серии (апудоциты), аминергические и пептидергические нейроны в универсальную диффузную нейроэндокринную систему – ДНЭС (diffuse neuroendocrine system – DNES). Было показано, что локализованные практически во всех органах и продуцирующие биологически активные вещества, клетки ДНЭС играют роль регуляторов гомеостаза, действующих через эндокринные, нейрокринные и паракринные механизмы.

Позднее было установлено, что нервная и иммунная системы имеют тесные взаимосвязи, участвующие в регуляции системного гомеостаза посредством продукции и секреции идентичных регуляторных пептидов (пептидных гормонов, цитокинов, хемокинов, интегринов и других молекул) [17]. Исследования на изолированных клеточных системах подтвердили, что многие регуляторные пептиды и биогенные амины синтезируются нейронами и клетками глии головного мозга.

Помимо нейронов, источниками цитокинов и других сигнальных молекул являются иммунокомпетентные клетки (макрофаги, Т-лимфоциты, эозинофильные лейкоциты, мастоциты, дендритные клетки), как резидентные,

так и мигрирующие в головной мозг при повреждении или воспалительных процессах.

Участие единых молекул в функционировании нервной, эндокринной и иммунной систем стимулировало на рубеже XX и XXI веков развитие новой области биомедицины – **нейроиммуноэндокринологии** [4, 8, 16, 19].

Необходимо подчеркнуть, что многочисленные исследования в этой области позволили установить чрезвычайно важный феномен: *нервные и иммунные клетки совместно с APUD-клетками представлены в большинстве висцеральных органов, где они продуцируют многочисленные пептиды и биогенные амины, идентичные таковым в мозге и центральных органах иммунной и эндокринной систем.*

Тесные взаимосвязи между тремя регуляторными системами обеспечивают структурно-функциональное отличительное свойство – иммунная и нервная системы представлены в висцеральных органах посредством пептидергических и аминергических нейронов (нервных волокон), иммунокомпетентных клеток, продуцирующих различные пептидные молекулы, тогда как эндокринная система представлена в центральной нервной системе APUD-клетками (например, нейросекреторные клетки гипоталамуса).

Таким образом, очевидно, что клетки всех трех классических регуляторных систем (нервной, эндокринной и иммунной) присутствуют в каждом органе, включая центральные органы регуляции гомеостаза (головной мозг, тимус, щитовидная железа и т. д.).

Учитывая это важное обстоятельство, представляется возможным объединить нейроны, APUD-клетки и иммунокомпетентные клетки, продуцирующие общие сигнальные молекулы в единую функциональную систему и расширить понятие «диффузная нейроэндокринная система – ДНЭС» (DNES) до «диффузная нейроиммуноэндокринная система – ДНИЭС» (diffuse neuroimmunoendocrine system – DNIES) [4, 7, 8].

Именно ДНИЭС является основной областью исследований нейроиммуноэндокринологии как новой научной биомедицинской дисциплины, интегрирующей знания о сигнальных механизмах регуляции гомеостаза.

Молекулярная общность гормональной сигнальной функции клеток

Современные исследования убедительно показывают, что основу биологической регуляции гомеостаза составляет строго координированное функциональное взаимодействие между эндокринной, нервной и иммунной системами, базирующееся на общности молекулярного языка клеточной сигнализации – едином механизме получения и переноса информации на субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях.

При этом надежность такого механизма поддержания гомеостаза обеспечивается «принципом перекрытия» регуляторных функций, который имеет место как в пределах каждой из регуляторных систем, так и в процессе их взаимодействия. Универсальность «принципа перекрытия» убедительно продемонстрирована в работах по изучению цитокинов и других пептидных сигнальных молекул. Общебиологическая роль этого принципа заключается в том, что в случае «выпадения» одного из звеньев регуляторной системы его

функции могут быть компенсированы другими, что возможно только при наличии общих механизмов функционирования и переноса информации.

Выполнение этого условия блестяще продемонстрировано экспериментальным феноменом, удачно названным «эффектом камертона» и являющегося очень важным для понимания механизма регуляции функций целостного организма. Он проявляется в том, что внутривенное введение или микроинъекция в мозг какого-либо синтезированного (подобно природному) пептида обязательно сопровождается изменением содержания и распределения других пептидов в крови и тканях мозга. При этом отмечены не только «камертонный отзвук и каскадное расширение возмущений» по типу «пептид-пептидных» взаимодействий, но и «пептид-моноаминовые» (и обратные) передачи взаимовлияний, которые включают в молекулярный химический язык не только фрагменты эндогенных пептидов, но и нейромедиаторы. Именно наличие общего универсального химического языка объединяет системы, управляющие жизнедеятельностью организма, в единый структурно-функциональный механизм регуляции его функций [3, 7].

В процессе изучения переноса сигнальной информации на молекулярном уровне исчезло строгое разграничение понятий «гормон» и «медиатор», поскольку для понимания физиологических процессов более важным оказалось сходство химического строения информационных молекул. Именно общность химического языка для нервных и соматических клеток гарантирует эффективность передачи сигналов внешних раздражителей, поступающих к сенсорной системе, для реализации конечных эффектов.

Исследование роли и значения клеточной сигнализации в регуляции биологических функций является крайне актуальной проблемой современной биомедицины. Многочисленными исследованиями, проведенными в последние два десятилетия, убедительно показано, что основные системы, ответственные за поддержание гомеостаза в многоклеточном организме (нервная, эндокринная и иммунная), имеют единый механизм химической регуляции, ключевым звеном которого является продукция и секреция огромного ряда молекул – клеточных медиаторов, осуществляющих эндокринную, нейрокринную, паракринную и аутокринную сигнальную передачу информации.

В последние годы внимание специалистов разных областей биомедицины сосредоточено на необычном феномене: многие так называемые «неэндокринные» клетки в живом организме продуцируют гормоны. В дополнение к нейронам и некоторым типам лимфоцитам, для которых эта способность была показана ранее, в настоящее время этот список может быть существенно расширен за счет большого числа других клеток.

Среди них – тучные клетки, естественные киллеры, эозинофильные лейкоциты, эпителиальные клетки тимуса, моноциты, тромбоциты, хондроциты, остеоциты, плацентарные трофобласты и амниотические клетки, клетки Лейдига семенников, клетки эндометрия, фоторецепторы и амакриновые клетки сетчатки, клетки Меркеля в коже, клетки Панета, макрофаги.

Спектр гормональных веществ, продуцируемых этими клетками, чрезвычайно широк и включает серотонин, мелатонин (MT), катехоламины, гистамин, эндорфины (END), эндотелины (ET), матрилизин, натрийуретический пептид, VIP, вазопрессин, окситоцин, тимозины, инсулин и инсулиноподобные

вещества, соматостатин, пролактин (PL), аденокортикотропный гормон (ACTH), лептин (LEP) и другие молекулы. Этот список может быть дополнен оксидом азота (NO), рассматриваемым сейчас в качестве газовой гормональной субстанции и продуцируемым эндотелиальными клетками сосудов, расположенных в различных тканях и органах [12, 13, 15, 23, 25].

Принимая во внимание основное свойство гормонов как биохимических молекул, продуцируемых в живом организме, оказывать действие на клетки-мишени через кровь (эндокринный путь), синапс (нейрокринный путь) или межклеточное пространство (паракринный путь), становится очевидным, что множество клеток различного происхождения могут рассматриваться как гормон-продуцирующие, независимо от химической природы веществ, синтезируемых ими.

В связи с этим представляется возможным рассматривать вышеприведенный перечень неэндокринных клеток как дополнительную часть универсальной системы ответа, контроля и защиты организма. При этом вырабатываемые ими гормональные вещества действуют как паракринные сигнальные молекулы для локальной координации межклеточных, межтканевых и межорганных взаимосвязей.

В то же время вещества, продуцируемые клетками ДНИЭС, могут действовать и как типичные гормоны, достигая разобщенных клеток-мишеней через кровоток. В обоих случаях такие неэндокринные клетки как тучные клетки, эозинофильные лейкоциты, моноциты, тромбоциты и макрофаги могут адсорбировать сигнальные молекулы из крови или межклеточного пространства, с тем чтобы транспортировать их в места, где они реализуют свои эффекты.

Таким образом, имеющиеся к настоящему времени многочисленные данные обоснованно позволяют пересмотреть один из фундаментальных постулатов классической эндокринологии – ***«гормональная функция есть специализированная функция эндокринных клеток, имеющих общее происхождение и сходное строение»,*** который правомочен звучать так: ***«гормональная функция является не специфической деятельностью отдельных клеток, а универсальной общебиологической функцией любых живых клеток, независимо от их происхождения и основной роли»*** [17].

Можно только удивляться выдающемуся предвидению Клода Бернара, который более 100 лет назад (в 1855 году) впервые предположил, что не только эндокринные железы, но многие органы в организме обладают способностью «внутренней секреции», которая является основным сигнальным механизмом регуляции гомеостаза.

Смелая для того времени гипотеза К. Бернара находит подтверждение в современных исследованиях. Изучение феномена гормональной функции неэндокринных клеток продолжает выявлять новые проявления передачи молекулярных сигналов различными клетками в процессе их коммуникаций и открывает дальнейшие перспективы в выяснении важной роли нейроиммуноэндокринной регуляции гомеостаза в норме и патологии.

Сигнальные молекулы: роль в персонифицированной диагностике и лечении социально значимых заболеваний

Понятие «персонифицированная медицина» (ПМ, другое название – предиктивная медицина) впервые было введено в научный лексикон в 1998 году для обозначения инновационного подхода к диагностике, профилактике и лечению социально значимых заболеваний. Базовой основой для развития ПМ является фармакология, современной важнейшей задачей которой является создание эффективных лекарственных препаратов таргетного (целенаправленного) действия [3].

Если ранее считалось, что лекарственные препараты могут являться универсальными при лечении какого-либо заболевания, то современные биомедиицнские исследования свидетельствуют о том, что эффективность применения того или иного лекарственного средства зависит от генетических и эпигенетических факторов, среди которых ключевое место занимают сигнальные молекулы, осуществляющие широкие межклеточные взаимодействия, нарушения которых лежат в основе патогенеза многих заболеваний.

Таким образом, исследование индивидуальных особенностей экспрессии сигнальных молекул в органах и тканях является перспективным и многообещающим направлением для разработки эффективных методов профилактики, диагностики и лечения различной патологии [3, 24].

ПМ включает в себя 6 основных разделов: молекулярную диагностику, интеграцию диагностики и лечения, мониторинг лечения, фармакогеномику, фармакогенетику и фармакопротеомику. Верификация и изучение экспрессии сигнальных молекул (биомаркеров) у конкретного пациента при той или иной патологии можно рассматривать как основной методологический подход к своевременной диагностике заболевания, выбору адекватной схемы лечения и оценке эффективности проводимой терапии.

В данном разделе представлен анализ значения персонифицированных возможностей клинической физиологии для оптимизации молекулярной диагностики и таргетного лечения некоторых распространенных социально значимых заболеваний (сердечно-сосудистой патологии, болезни Альцгеймера и хронической обструктивной болезни легких).

Персонифицированный подход к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний. Сердечно-сосудистые заболевания являются причиной ежегодной смертности около 20 млн. человек во всем мире, что обусловливает их высокую социальную значимость и необходимость разработки новых подходов к лечению и ранней диагностике. Сердечно-сосудистые заболевания включают в себя гипертоническую болезнь (ГБ), ишемическую болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда (ИМ) и ряд других патологий.

ГБ представляет собой полиэтиологическое заболевание и является причиной высокой смертности среди лиц среднего и пожилого возраста. ГБ, несмотря на наличие множества антигипертензивных средств, поддается успешному лечению только в 27% случаев.

Сложность молекулярно-генетического анализа ГБ заключается в большом количестве потенциальных генов-кандидатов, способных участвовать в формировании предрасположенности к этому заболеванию. Известно

более 150 таких генов, включающих в себя компоненты ренин-ангиотензиновой системы, метаболизма липидов, продукты, обеспечивающие поддержание сосудистого тонуса и структуры сосудов [2].

В настоящее время в рамках ПМ существует два подхода к лечению и диагностике ГБ: 1) поиск оптимального сочетания антигипертензивных средств и 2) изучение популяционных особенностей полиморфизмов генов, участвующих в развитии ГБ.

Применение молекулярной диагностики позволяет увеличить эффективность проводимого лечения ГБ. Установлено, что реакции на препарат фосиноприл (ингибитор ангиотензин-ковертирующего фермента) у пациентов с ГБ зависят от полиморфизма гена данного фермента. Специальные исследования позволили разработать тест, базирующийся на молекулярной диагностике полиморфизмов ряда генов, ассоциированных с ГБ, на основе которого проводили подбор наиболее эффективного антигипертензивного средства: β-адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, диуретиков и их сочетания [2].

Также предлагается использование анализа полиморфизма генов липопротеинлипазы, аполипопротеина Е и I/D (кодирующих полиморфизм ангиотензинпревращающего фермента) у больных ИБС различного возраста со следующими вариантами течения заболевания: стабильной стенокардией II-III функционального класса, нестабильной стенокардией, инфарктом миокарда (ИМ), постинфарктным кардиосклерозом для первичной и вторичной профилактики ИБС. Показано, что аллели DD гена ангиотензинпревращающего фермента, H+/+ гена липопротеинлипазы и E3E4 увеличивают вероятность развития ИМ у больных ИБС.

Наличие у пациента генотипа DD повышает вероятность развития повторного ИМ. Носительство аллеля гена DD ассоциировано с личностно-поведенческими особенностями, которые являются психологическими факторами риска ИБС и предрасполагают к позднему обращению за медицинской помощью. Аллель ε2 гена аполипопротеина Е и аллель Н гена липопротеинлипазы чаще встречаются у больных ИБС в возрасте старше 90 лет по сравнению с более молодыми пациентами, что позволяет рассматривать их в качестве маркеров стабильного течения ИБС.

По мнению ряда авторов, проявление генетического полиморфизма в значительной мере зависит от генофонда и условий жизни каждой конкретной популяции. Показано, что маркерами предрасположенности к ГБ у русского населения являются сочетания аллелей 174M-235T-(-20C) и T174-235T-(-20C) полиморфных локусов T174M, M235T, A-20C гена ангиотензиногена, причем сочетание данных аллелей приводит к раннему (до 45 лет) проявлению заболевания. В популяции лиц татарской национальности с повышенным риском развития ГБ ассоциирован полиморфизм гена аполипопротеина Е e2e3e4. При этом установлено, что повышенный уровень содержания липидов в сыворотке крови (общего холестерина и 3-липопротеинов) при ГБ у татар ассоциирован с полиморфными маркерами T174M, M235T гена ангиотензиногена, e2e3e4 гена аполипопротеина Е, Glnl92Arg гена параоксоназы I, гена липопротеинлипазы, в то время как в популяции русского населения – с eNOS4a/4b гена эндотелиальной синтазы оксида азота и гена Hind III.

Как уже упоминалось, с ГБ тесно связана другая патология сердечно-сосудистой системы – ИМ. В молекулярной диагностике ИМ важную роль играет анализ сигнальных молекул, участвующих в програмированной клеточной гибели – апоптозе миокардиоцитов и эндотелиоцитов, интенсивность синтеза которых характеризует эффективность лечения ИМ, его длительность и связь с функциями эндотелия и воспалительным процессом в сосудах.

В исследовании образцов сыворотки крови у 150 больных острым ИМ и 44 здоровых волонтеров была изучена динамика экспрессии ряда сигнальных молекул в процессе апоптоза. Динамику показателей оценивали на 10 и 20-28 день наблюдения, что соответствует переходу острой стадии заболевания в стадию заживающего инфаркта и стадию рубцевания. Установлено, что в первые 3 дня от начала ИМ у 74% больных повышается уровень sFas протеина, что указывает на рецепторный (Fas-связанный) тип развития апоптоза.

Концентрация адгезивных молекул ICAM-3 и CD38 повышалась в группе больных с Q-инфарктом но не изменялась у пациентов с другими формами ИМ. Кроме того, была выявлена корреляция между экспрессией сигнальных молекул sFas и sICAM-1, что свидетельствует о наличии патогенетической общности между процессами апоптоза миокардиоцитов и дисфункцией эндотелия и/или сосудистым воспалением у больных с ИМ.

Таким образом, исследование уровня экспрессии сигнальных молекул sFas, sICAM-1 ICAM-3, CD38 отражает степень апоптоза и активность воспалительных процессов в постинфарктном периоде, что можно использовать для оценки эффективности проводимой терапии и прогноза течения ИМ.

Установлено, что повышенное содержание молекулы адгезии эндотелиоцитов сосудов VCAM-1 (CD106) связано с высоким риском развития ИМ. Кроме того, молекула VCAM-1, экспрессируемая эндотелиоцитами, является маркером регенерации после ИМ, способствуя адгезии мезенхимальных стволовых клеток в область поврежденного сосудистого эндотелия.

Степень тяжести ИМ характеризуется уровнем экспрессии другой сигнальной молекулы – хемокина RANTES. Фактор некроза опухолей TNF-α играет двойственную роль в развитии ИМ при окклюзии коронарных сосудов: если у 4-месячных крыс TNF-α выполняет кардиопротекторную роль, то у 24-месячных животных этот белок способствует развитию ИМ, что может быть связано с ослаблением экспрессии TNF-рецептора на эндотелиоцитах при их старении. В целом высокий уровень сывороточного TNF-α расценивается как маркер риска развития ИМ, а в постинфарктном периоде концентрация TNF-α коррелирует с его тяжестью.

Таким образом, использование молекулярной медицины находит широкое применение в прогнозировании, диагностике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Так, анализ экспрессии генов, коррелирующих с развитием ГБ и ИБС, способствует выбору оптимальной тактики лечения, проведению профилактики и установлению популяционных особенностей данной патологии. Использование при ИМ маркеров апоптоза и других сигнальных молекул способствует оптимизации дифференциальной диагностики, прогнозированию течения постинфарктного периода, оценке эффективности лечения.

Персонифицированный подход к диагностике и лечению болезни Альцгеймера. Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, характеризующееся необратимым ухудшением когнитивных и физических функций. В связи с увеличением качества и продолжительности жизни в мире БА становится одной из главных причин смерти и приобретает статус возрастающей проблемы общественного здоровья.

Сигнальные молекулы (маркеры), участвующие в процессе нейродегенерации при БА (бета-амилоид, тау-протеин, убиквитин и другие), успешно верифицируются в ткани головного мозга при аутопсии. Так, бета-амилоидные нити, образованные одним из пептидов, слипаются в межклеточном пространстве в плотные образования, известные как сенильные бляшки, которые разрушают внутриклеточную транспортную систему нейрона [5].

Невозможность взятия биопсии мозга существенно ограничивает прижизненную молекулярную диагностику БА, однако в последние годы наметился существенный прогресс в этом направлении [26].

Проведенные биомедицинские исследования убедительно показали, что БА можно рассматривать не как ограниченную патологию ЦНС, а как системное заболевание, что открывает возможности использовать клетки и ткани, доступные для биопсии для разработки подходов к прижизненной диагностике БА.

Перспективным и многообещающим является верификация и изучение экспрессии тау-протеина и бета-амилоида у пациентов БА в лимфоцитах крови) и тучных клетках в биоптатах желудка и кожи. Показаны достоверные отличия в уровнях экспрессии указанных молекул у пациентов с БА и здоровых волонтеров.

Кроме того, в головном мозге больных БА продемонстрировано понижение уровня экспрессии протеинкиназы С. При использовании фибробластов кожи пациентов со спорадической формой БА и здоровых доноров было установлено, что снижение активности протеинкиназы С приводит к снижению секреции белка-предшественника В-амилоида (APP) в клетках пациентов с БА. У пациентов с наследственной формой БА экспрессия белка APP в фибробластах кожи была повышена в 2 раза по сравнению со здоровыми донорами [5].

Повышенная секреция белка APP в фибробластах кожи может быть верифицирована значительно раньше появления первых клинических симптомов БА, что позволяет своевременно диагностировать данную патологию и возможно в ряде случаев оптимизировать ее профилактику.

Установлено, что в фибробластах пациентов с БА на 40% снижен синтез митохондриального фермента а-кетоглутаратдегидрогеназы. Кроме того, в фибробластах и тромбоцитах пациентов с БА выявлено снижение активности цитохром С оксидазы.

Важную роль в патогенезе БА играют мутации гена белка аполипопротенина Е (ApoE). ApoE является протеином плазмы крови, участвующим в транспорте холестерола [6].

ApoE продуцируется астроцитами и вовлечен в рост и восстановление клеток нервной системы. При БА ApoE ассоциирован с внеклеточными сенильными бляшками, внутриклеточными нейрофибриллярными клубками

и участками ангиопатии. Ген АроЕ локализован в хромосоме 19 и представлен 3 аллелями: е2, е3, е4, которые определяют АроЕ полиморфизм. Анализ аллелей АроЕ у пациентов с БА и здоровых доноров продемонстрировал четкую связь аллеля АроЕ е4 с поздней манифестацией БА. Частота аллеля АроЕ е4 у 30 пациентов составила 0.50±0.06 против частоты 0.16±0.03 у здоровых пациентов того же возраста.

Подобные результаты были получены со спорадической формой БА при позднем начале заболевания. Увеличение частоты встречаемости аллеля е4 при спорадическом типе БА с поздним началом было продемонстрировано в американской, финской, японской и итальянской популяциях.

Существует мнение, что наличие одного или двух аллелей АроЕ коррелирует со степенью выраженности БА. У пациентов, гомозиготных по АроЕ е4 в сравнении с пациентами, гомозиготными по АроЕ е3 были более выражены отложения β-амилоида в сосудах и головного мозга. При этом наследование аллеля АроЕ е4 связано с более ранним началом заболевания: средний возраст во время начала заболевания снижается с 83 до74 лет, по мере того как число аллелей АроЕ е4 увеличивается от 0 до 2. Этот факт послужил основой гипотезы о том, что АроЕ е4 является фактором риска для БА, что предполагает потенциальное использование оценки АроЕ генотипа в качестве диагностического теста.

Генотипирование по АроЕ может быть использовано для выявления степени риска развития БА, для прогнозирования эффективности проводимого лечения и динамики развития патологии. Так, например, подбор курса лечения на основе данных молекулярной диагностики мутаций указанного гена позволяет оценить эффективность проводимой терапии у пациентов с БА. Установлено, что для носителей генотипа аполипопротенина Е4/4 эффективность лечения была ниже, чем у людей с генотипом аполипопротенина Е3/4.

Таким образом, верификация ключевых белков, участвующих в патогенезе БА – тау-протеина и бета-амилоида во внемозговых тканях, открывает новые перспективы в персонифицированной диагностике, профилактике и лечении этого социально значимого заболевания.

Кроме того, оценка уровня экспрессии сиртуинов, протеинкиназы С, белка APP и генотипа АроЕ позволяет успешно прогнозировать сроки манифестации спонтанной и наследственной форм БА и оценивать эффективность проводимого лечения [6, 10].

Персонифицированный подход к диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является социально значимым заболеванием вследствие широкой распространенности, прогрессирующего течения и сокращения продолжительности жизни больных. Смертность от ХОБЛ среди лиц старше 45 лет занимает 4-5 место в общей структуре летальности. По данным ВОЗ, в течение ближайшего десятилетия предполагается значительное увеличение частоты ХОБЛ и смертности от этого заболевания.

ХОБЛ – заболевание, характеризующееся частично необратимой бронхиальной обструкцией. В настоящее время диагностика ХОБЛ основана на оценке клинических симптомов и параметров вентиляционной функции легких. Однако данные методы не позволяют объективно определить

выраженность воспалительного процесса, эффективность лечения и прогноз течения заболевания. В связи с этим поиск молекулярных маркеров топического и системного воспаления с целью совершенствования диагностики и лечения ХОБЛ является актуальной задачей ПМ [6, 18].

Известно, что при ХОБЛ формирование и прогрессирование хронического воспаления обусловлено повышением числа нейтрофилов, активацией альвеолярных макрофагов и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в бронхолегочной ткани.

Установлена сопряженность прогрессирования бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ с увеличением сывороточного содержания сигнальных молекул HLA-I, HLA-II, ICAM-1, CD8, и снижением уровня CD95 в крови, с повышением концентрации HLA-I, sHLA-II в индуцированной мокроте и конденсате выдыхаемого воздуха, с увеличением уровня ICAM-1 и снижением содержания CD8 молекул в индуцированной мокроте и с уменьшением концентрации CD95 и CD25 в конденсате выдыхаемого воздуха.

При этом обострение у пациентов с ХОБЛ в зависимости от стадии заболевания характеризуется изменением фенотипа эндобронхиальных и циркулирующих мононуклеарных клеток, несущих на своей поверхности молекулярные маркеры CD4, CD8, CD16, CD25, CD38, CD50, CD54, CD95, HLA-I и HLA-DR.

У больных ХОБЛ независимо от степени тяжести заболевания повышено относительное количество циркулирующих $CD16^+$, эндобронхиальных $CD38^+$ мононуклеарных клеток и снижено число системных клеток, экспрессирующих молекулы адгезии ICAM-1 и ICAM-3. Выявлена взаимосвязь содержания циркулирующих $CD54^+$ мононуклеарных клеток и прогрессирования бронхиальной обструкции. Кроме того, прогрессирование ХОБЛ коррелирует с содержанием цитокинов ИЛ-1α, ИЛ-4, ИЛ-8, INF γ, TNF-β в периферической крови и индуцированной мокроте [6].

Также предлагается для диагностики ХОБЛ и оценки эффективности проводимого лечения использовать молекулярные маркеры ремоделирования межклеточного матрикса.

Известно, что матриксные металлопротеиназы (MMP) и их ингибитор TIMP регулируют межклеточные взаимодействия в различных органах и тканях. При ХОБЛ обнаружено повышение уровня экспрессии MMP-1 и MMP-9 в бронхоальвеолярном смыве и мокроте.

Увеличение содержания MMP-9 верифицировано в альвеолярных макрофагах пациентов с ХОБЛ. Однако авторы данного исследования полагают, что использование маркера MMP-9 для диагностики и оценки эффективности лечения ХОБЛ возможно только в совокупности с другими сигнальными молекулами.

В пользу этого предположения свидетельствует исследование, проведенное И.Я. Цеймах и соавт., в котором для оценки эффективности лечения ХОБЛ применяется ряд сигнальных молекул, включая MMP-9. В исследовании сыворотки крови 74 человек с клиническими признаками инфекционно-зависимого обострения ХОБЛ с помощью иммунофлуоресцентного метода оценивали эффективность стандартной терапии и ацетилцистеина.

Установлено, что системное воспаление у больных с обострением ХОБЛ характеризуется повышением содержания С-реактивного белка плазмы,

интерлейкина-6, ММР-1, а также снижением экспрессии пептида, активирующего нейтрофилы NAP-2 по сравнению с контрольной группой здоровых людей.

Активация системных воспалительных реакций ассоциируется с возрастанием содержания в плазме крови показателей эндотелиальной дисфункции и тромбинемии – эндотелина-1 и D-димеров. Экспрессия ММР-9 находилась в обратной корреляционной связи с содержанием С-реактивного белка в периферической крови, что позволяет расценивать ее как маркер системного воспаления у больных ХОБЛ.

Антиоксидантная терапия с применением N-ацетилцистеина сопровождается снижением показателя адаптивного иммунного ответа интерлейкина-6 до уровня, сопоставимого с нормальными значениями. Действие антиоксиданта также ассоциировалось с высоким уровнем ММР-9 и сниженной экспрессией хемокина NAP-2.

Таким образом, для диагностики стадии ХОБЛ и прогнозирования течения заболевания возможно применение маркеров иммунных клеток, молекул основного комплекса гистосовместимости и цитокинов. При этом для оценки эффективности лечения ХОБЛ в качестве важнейших молекулярных маркеров можно рассматривать матриксные металлопротеиназы, С-реактивный белок и хемокины.

Приведенные данные и результаты других многочисленных биомедицинских молекулярно-генетических исследований убедительно свидетельствуют о том, что ПМ становится передовым направлением современной диагностики, оценки эффективности лечения и разработки новых фармацевтических препаратов таргетного действия.

Верификация и оценка экспрессии сигнальных молекул и их взаимодействий в различных тканях и органах открывает новые многообещающие перспективы для своевременной диагностики и оптимизации лечения практических всех известных заболеваний. Применение молекулярных методов в ПМ позволяет разрабатывать персональный (индивидуальный) алгоритм лечения и профилактики различных социально значимых заболеваний, что в данном обзоре продемонстрировано на примере сердечно-сосудистых заболеваний, БА И ХОБЛ.

В настоящее время в связи с бурным развитием высокотехнологичной методологии биомедиицнских исследований большое значение придается разработке неинвазивных способов молекулярной диагностики заболеваний. В этой связи в качестве перспективного биологического объекта рассматривается буккальный эпителий, в клетках которого в последние годы верифицирован широкий спектр сигнальных молекул [9].

Сигнальные молекулы в буккальном эпителии: оптимизация диагностики социально значимых заболеваний. Одним из наиболее распространенных и эффективных методов молекулярной диагностики заболеваний является иммуноцито/гистохимия. Однако его прогностическая ценность во многом ограничена вследствие инвазивности доступа для получения исследуемого материала. В связи с этим актуальной задачей современной молекулярной медицины является поиск клеточных и тканевых объектов исследования, получение которых доступно неинвазивным путем.

В последние годы внимание исследователей в качестве возможного материала для неинвазивной диагностики привлекает буккальный эпителий (БЭ) [9].

Забор материала со внутренней поверхности щеки является неинвазивной процедурой. Кроме того, данный объект исследования обладает большой информативностью (изучение экспрессии сигнальных молекул, возможность оценки электрокинетических характеристик клеток и т. п.) и может быть применим для прижизненной диагностики социально значимых заболеваний.

БЭ можно рассматривать как пограничную зону между внешней и внутренней средой организма. Таким образом, изменения функциональной активности клеток БЭ (процессы клеточного обновления и дифференцировки, экспрессия различных сигнальных молекул) во многом отражают состояние локального и системного гомеостаза организма или его нарушения при патологических состояниях. Следовательно, БЭ, доступный для прижизненного гистологического исследования, может служить источником важной диагностической и прогностической информации о состоянии здоровья, стрессовых воздействиях, влиянии факторов внешней среды, соматической патологии и биологического возраста человека.

Использование БЭ для диагностики воспалительных процессов и состояния локального иммунитета. Установлено, что БЭ принимает участие в иммунном ответе и межклеточных взаимодействиях, секретируя ряд сигнальных молекул – цитокины, хемокины, ростовые и гемопоэтические факторы, эйкозаноиды, оксид азота, эндотелины, пептидные медиаторы, молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA). Секретируемые БЭ сигнальные молекулы регулируют активность иммунных клеток, что, в свою очередь, определяет развитие острых и хронических воспалительных реакций слизистых оболочек [14].

БЭ секретирует ряд цитокинов: ИЛ-6, ИЛ-8, INFγ, простагландин Е2 (ПГ Е2) и лейкотриены (ЛТ). На мембране БЭ верифицированы антигенпрезентирующие (HLA-1, HLA-2), коадгезивные (CD54) и костимулирующие (CD40) молекулы. Уровень их экспрессии в БЭ зависит от функционального состояния клеток, изменяясь под влиянием различных воздействий. При культивировании БЭ с E. coli наблюдалось усиление секреции ПГ Е2 и повышение уровня внутриклеточного кальция. Вероятно, этот процесс коррелирует с синтезом антимикробных пептидов (дифенсинов). Наличие в БЭ катионных пептидов со свойствами дифенсинов было показано методом иммуногистохимии. Таким образом, иммуногистохимический анализ экспрессии ПГ Е2 в клетках БЭ может служить диагностическим признаком бактериальных инфекций.

Иммунологическая функция БЭ регулируется интерферонами. Установлено, что под действием INFα усиливается секреция в БЭ ИЛ8 и GM-CSF. Кроме того, в БЭ INFα и INFβ индуцируют экспрессию гена ISG-15, активирующего образование гамма-интерферона, пролиферацию и цитотоксичность NK-клеток. В исследованиях на клетках буккальной карциномы отмечено потенцирующее действие INFγ на экспрессию молекул HLA, CD40 и CD54. В БЭ, зараженном C. Albicans, секреция гамма-интерферона коррелировала с появлением активной формы ИЛ-18 – индуктора INFγ. мРНК,

и белок-предшественник ИЛ-18 конститутивно экспрессируются оральными эпителиоцитами, но активная форма образуется лишь при их стимуляции.

При воспалительных заболеваниях ротовой полости (пародонтит, гингивит) наблюдалось изменение степени дифференцировки БЭ и снижение количества сиаловой кислоты в мембранах клеток.

Установлено, что апоптоз и изменения ядерной структуры БЭ коррелируют с аналогичными показателями в эпиптелиальных клетках бронхов у детей, страдающих атопической бронхиальной астмой. У пациентов был повышен уровень цитогенетических нарушений в клетках БЭ (доля клеток с микроядрами, протрузиями и апоптозом) по сравнению со здоровыми детьми. Более выраженные изменения отмечались в период обострения и при тяжелом течении заболевания. При этом изменения БЭ соответствуют картине, выявленной в бронхиальном эпителии, что свидетельствует об однонаправленных изменениях в этих клеточных популяциях в организме при развитии данной патологии.

Известно, что астма как хроническая иммунная патология легких связана со снижением количества TCR-рецепторов на поверхности Т-клеток. При исследовании БЭ, полученного от 95 детей, больных астмой, и 455 здоровых доноров, было установлено, что количество α- и β-TCR-рецепторов у здоровых и больных детей не различалось, однако при бронхиальной астме наблюдалось достоверное снижение гамма-TCR рецепторов. В дальнейшем авторы исследования планируют установить, является ли снижение численности γ-TCR-рецепторов в пробах БЭ признаком, обусловливающим предрасположенность организма к развитию аллергических реакций, или этот процесс является следствием развития бронхиальной астмы и может служить маркером течения данного хронического заболевания. Представляется вероятным, что изменение численности γ-TCR-рецепторов в БЭ отражает функциональное состояние Т-клеточного звена иммунной системы.

Использование БЭ для дифференциальной диагностики язвенного колита и болезни Крона. БЭ является первым барьером на пути бактерий, являющихся этиопатогенетическим фактором заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности болезни Крона. Болезнь Крона (Crohn's disease) представляет собой хроническое неспецифическое гранулематозное воспаление, которое может поражать все отделы желудочно-кишечного тракта (от полости рта до прямой кишки) с преимущественным поражением терминального отрезка подвздошной кишки (илеоколитом) в 50 % случаев. Болезнь Крона и язвенный колит имеют много общих патофизиологических и эпидемиологических характеристик и часто требуют дифференциальной диагностики между собой.

В исследовании БЭ, полученного от 14 детей и 17 взрослых пациентов с болезнью Крона и 17 детей с язвенным колитом, а также 40 здоровых людей (группа сравнения), было выявлено различие уровня хемокинов между группами. Установлено, что у детей с болезнью Крона в БЭ был повышен уровень экспрессии CXCL8, CXCL9 и CXCL10, тогда как в других исследуемых группах по сравнению с контролем таких различий не наблюдалось. При стимуляции *in vitro* БЭ зимозаном отмечено повышение экспрессии маркера CXCL8 у детей с язвенным колитом и болезнью Крона. Таким

образом, иммуногистохимическая оценка экспрессии хемокинов CXCL8, CXCL9 и CXCL10 в БЭ может использоваться в дифференциальной диагностике воспалительных процессов кишечника у детей [14].

Использование БЭ для оценки влияния на организм неблагоприятных факторов окружающей среды. Содержание SH-групп в цитоплазме клеток и частота встречаемости микроядер в клетках БЭ может служить адекватным показателем для определения уровня ксеногенной интоксикации и адаптационного статуса организма.

При сравнительном анализе содержания SH-групп в клетках БЭ у детей в возрасте 4-6 лет, разделенных на 3 группы (здоровые, с повышенной заболеваемостью острыми респираторными инфекциями и гиперплазией щитовидной железы в сочетании с проживанием в техногенно насыщенном районе города) установлено, что у детей 3 группы наблюдалось снижение содержания SH-групп в БЭ. Поскольку гиперплазия щитовидной железы часто является следствием ксеногенного микроэлементоза, можно выдвинуть предположение о том, что неблагоприятные факторы внешней среды, вызывающие патологические процессы в организме, отражаются на состоянии клеток БЭ.

Исследовались корреляции между цитогенетическими нарушениями в клетках БЭ (частота встречаемости микроядер) у детей 5-6 лет и подростков 15-16 лет и степенью загрязнения окружающей среды. Установлено, что увеличение числа клеток БЭ, содержащих микроядра, возрастает у детей, проживающих в районах с высоким содержанием токсикантов в воздухе и почве, причем более высокая чувствительность к воздействию неблагоприятных экзогенных факторов выявлена у детей 5-6 лет по сравнению с подростками.

Одним из распространенных неблагоприятных воздействий на организма является сигаретный дым. При анализе БЭ в образцах слизи из ротовой полости при пародонтитах установлено, что под влиянием табачного дыма в БЭ усиливается экспрессия проапоптотического фактора Bax при одновременном снижении уровня антиапоптозного фактора Bcl-xL и каспазы-3.

Таким образом, благодаря анализу экспрессии различных сигнальных молекул в БЭ установлены некоторые молекулярно-клеточные механизмы развития пародонтита (снижение клеточной миграции) и канцерогенеза (нарушение экспрессии Bax, Bcl-xL и caspase-3), обусловленных воздействием экологически вредных факторов.

Использование БЭ для оценки биологического возраста человека. В литературе имеются сообщения о разработке новой методики определения биологического возраста и интегральной оценки состояния организма при сахарном диабете, основанной на измерении электрокинетических характеристик клеток БЭ (электроподвижность, скорость движения, электроотрицательность ядра) *in vitro* с применением микроэлектрофореза ядер.

Клетки БЭ оказались оптимальным объектом для проведения этого исследования, так как они имеют крупное ядро овальной формы и высокую жизнеспособность *in vitro*. В исследовании, проведенном на 2000 человек в возрасте от 2 до 80 лет, было установлено, что электроотрицательность ядер БЭ изменяется в течение жизни по пораболической зависимости. Примерно до 30 лет электроотрицательность ядер БЭ возрастает, а затем начинает снижаться.

Авторы работы полагают, что по коэффициенту наклона первой части кривой (степень возрастания электроотрицательности БЭ) можно спрогнозировать симметричный процесс снижения этого показателя после 30 лет и таким образом рассчитать приблизительную продолжительность жизни.

Применение оценки биологического возраста по этой методике у больных сахарным диабетом позволило выявить достоверное изменение электрокинетических характеристик ядер БЭ в сравнении со здоровыми людьми. Показано, что у больных сахарным диабетом 1 типа биологический возраст на 5-7 лет больше хронологического, тогда как у пациентов с сахарным диабетом 2 типа этот разрыв увеличивается до 8-10 лет.

Эти данные коррелировали с изменением биохимических показателей крови (уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина, общего холестерина, триглицеридов) у лиц с сахарным диабетом 1 и 2 типов. Увеличение концентрации указанных показателей в 2-8 раз по сравнению со здоровыми людьми указывает на ускоренный темп старения организма и различия в состоянии метаболических показателей в зависимости от типа сахарного диабета. Таким образом, оценка электрокинетических показателей ядер БЭ является неинвазивным и высокоинформативным методом для оценки биологического возраста и темпов старения организма при метаболических нарушениях.

Обобщая данные по использованию БЭ для молекулярной диагностики различной патологии можно сделать вывод о том, что этот объект, получаемый неинвазивным путем, может найти широкое применение благодаря способности его клеток экспрессировать сигнальные молекулы, регулирующие межклеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, отражая тем самым состояние и нарушения локального и системного гомеостаза.

Использование БЭ для целей молекулярной диагностики пока не получило достаточно широкого распространения, однако перспективность развития подобной методологии в молекулярной медицине не вызывает сомнений, если учесть широкий диапазон социально значимых заболеваний, в механизме которых активную роль играют сигнальные молекулы, экспрессия которых верифицирована в БЭ.

Таким образом, вышеизложенные сведения отражают важную роль нейроиммуноэндокринных межклеточных взаимоотношений в регуляции процессов жизнедеятельности. Результаты современных исследований убедительно свидетельствуют о том, что современные представления о патогенезе различных заболеваний не могут формироваться без учета огромного и важного вклада в этот процесс биологических эффектов многочисленных сигнальных молекул, синтезируемых в клетках ДНИЭС, расположенных во всех висцеральных органах.

Дальнейшее развитие интегральных взглядов о молекулярной общности регуляторных систем (как на центральном, так и особенно на локальном уровнях) еще более расширит существующие представления о механизмах возникновения и развития социально значимых заболеваний.

Формирование единого представления о нейроиммуноэндокринной регуляции процессов жизнедеятельности в норме и при патологии открывает новые перспективы в клинической физиологии для оптимизации и разработки высокоэффективных методов персонифицированной профилактики, диагностики и лечения заболеваний.

Список литературы

1. *Богомолец А.А.* Руководство по патологической физиологии. Т. 1. М.: Биомедгиз, 1937. 376 с.

[*Bogomolets A.A.* Rukovodstvo po patologicheskoj fiziologii = Manual of Pathological Physiology. T. 1. M.: Biomedgiz, 1937. 376 p. (In Russ.)].

2. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Пальцева Е.М. и др.* Молекулярные механизмы заболеваний сердечно-сосудистой системы. С.-Пб.: «Эко-Вектор», 2021, 189 с.

[*Paltsev M.A., Kvetnoj I.M., Pal'ceva E.M. et al.* Molekulyarnye mekhanizmy zabolevanij serdechno-sosudistoj sistemy = Molecular mechanisms of the cardiovascular system diseases. S.-Pb.: «Eko-Vektor», 2021, 189 p. (In Russ.)]

3. *Пальцев М.А.* Введение в молекулярную медицину. М.: Медицина. 2004. 496 с.

[*Paltsev M.A.* Vvedenie v molekulyarnuyu medicine = Introduction to Molecular Medicine. M.: Medicina. 2004. 496 p. (In Russ.)]

4. *Пальцев М.А., Кветной И.М.* Руководство по нейроиммуноэндокринологии. 3-е изд. М.: «Шико», 2014, 752 с.

[*Pal'cev M.A., Kvetnoj I.M.* Rukovodstvo po nejroimmunoendokrinologii = Guide to neuroimmunoendocrinology. 3-e izd. M.: «Shiko», 2014, 752 p. (In Russ.)]

5. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Зуев В.А. и др.* Нейродегенеративные заболевания. Молекулярные основы патогенеза, прижизненной персонифицированной диагностики и таргетной фармакотерапии. С-Пб.: «Эко-Вектор», 2019, 200 с.

[*Pal'cev M.A., Kvetnoj I.M., Zuev V.A. et al.* Nejrodegenerativnye zabolevaniya. Molekulyarnye osnovy patogeneza, prizhiznennoj personificirovannoj diagnostiki i targetnoj farmakoterapii = Neurodegenerative diseases. Molecular basis of pathogenesis, lifelong personalized diagnostics and targeted pharmacotherapy. S-Pb.: «Eko-Vektor», 2019, 200 p. (In Russ.)]

6. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др.* Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии. С-Пб.: «Наука», 2012, 463 с.

[*Pal'cev M.A., Kvetnoj I.M., Polyakova V.O. et al.* Nejroimmunoendokrinnye mekhanizmy stareniya i vozrastnoj patologii = Neuroimmunoendocrine mechanisms of aging and age-related pathology. S-Pb.: «Nauka», 2012, 463 p. (In Russ.)]

7. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др.* Нейроиммуноэндокринные межклеточные взаимодействия в норме и при патологии. Образы конфокальной микроскопии: Атлас. М.: «Шико», 2015, 155 с.

[*Pal'cev M.A., Kvetnoj I.M., Polyakova V.O. et al.* Nejroimmunoendokrinnye mezhkletochnye vzaimodejstviya v norme i pri patologii. Obrazy konfokal'noj mikroskopii: Atlas = Neuroimmunoendocrine intercellular interactions in normal and pathological conditions. Confocal microscopy images: Atlas. M.: «Shiko», 2015, 155 p. (In Russ.)]

8. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др.* Избранные лекции по нейроиммуноэндокринологии. М.: «Шико», 2015, 277 с.

[*Pal'cev M.A., Kvetnoj I.M., Polyakova V.O. et al.* Izbrannye lekcii po nejroimmunoendokrinologii = Selected Lectures on Neuroimmunoendocrinology. M.: «Shiko», 2015, 277 p. (In Russ.)]

9. *Полякова В.О., Пальцева Е.М., Крулевский В.А.* Буккальный эпителий. Новые подходы к молекулярной диагностике социально значимой патологии. СПб.: «Н-Л», 2015, 128 с.

[*Polyakova V.O., Pal'ceva E.M., Krulevskij V.A.* Bukkal'nyj epitelij. Novye podhody k molekulyarnoj diagnostike social'no-znachimoj patologii = Buccal epithelium. New approaches to molecular diagnostics of socially significant pathology. SPb.: «N-L», 2015, 128 p. (In Russ.)]

10. *Пухальская А.Э., Дятлова А.С., Линькова Н.С., Кветной И.М.* Сиртуины: роль в регуляции окислительного стресса и патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Успехи физиологических наук 2021; 52(1):90–104.

[*Puhal'skaya A.E., Dyatlova A.S., Lin'kova N.S., Kvetnoj I.M.* Sirtuins: a role in the regulation of oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Uspekhi fiziologicheskih nauk = Advances in the physiological sciences 2021;52(1):90-104. (In Russ.)]

11. *Chapman C.R., Tuckett R.P., Song C.W.* Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. J. Pain 2008; 9(2):122–145.

12. *Chitimus D.M., Popescu M.R., Voiculescu S.E. et al.* Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. Biomolecule. 2020; 10:1211.

13. *Cipolla-Neto J., Amaral F.G.* Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. Endocr. Rev. 2018; 39(6):990–1028.

14. *Damen G.M., Hol J., de Ruiter L. et al.* Chemokine production by buccal epithelium as a distinctive feature of pediatric Crohn disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006; 42(2):142–149.

15. *Ivanov D., Mazzoccoli G., Anderson G. et al.* Melatonin, Its Beneficial Effects on Embryogenesis from Mitigating Oxidative Stress to Regulating Gene Expression. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22:5885.

16. *Kvetnoy I., Ivanov D., Mironova E., et al.* Melatonin as the Cornerstone of Neuroimmunoendocrinology. Int J Mol Sci. 2022; 6; 23(3):1835–1846.

17. *Kvetnoy I.M.* Neuroimmunoendocrinolgy: Where is the field for study? Neuroendocrinol. Lett. 2002; 23:119–120.

18. *Mazzoccoli G., Kvetnoy I.M., Mironova E. et al.* The melatonergic pathway and its interactions in modulating respiratory system disorders. Biomed. Pharmacother. 2021;137:111397.

19. *O'Brien C., Haberman E., Domingos A.* A Tale of Three Systems: Toward a Neuroimmunoendocrine Model of Obesity. Annu Rev Cell Dev Biol. 2021; 6(37):549–573.

20. *Pearse A.G.E.* The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. J. Histochem. Cytochem. 1969; 17:303–313.

21. *Pearse A.G.E.* The diffuse endocrine system and the implications of the APUD concept. Int. Surg. 1979; 64(2):5–7.

22. *Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M., Tolkachev V.N.* Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. Nature. 1975; 255:344–345.

23. *Reiter R.J., Sharma R., de Campos Zuccari D.A.P. et al.* Melatonin synthesis in and uptake by mitochondria: implications for diseased cells with dysfunctional mitochondria. Future Med. Chem. 2021; 13(4):335–339.

24. *Rodichkina V., Kvetnoy I.M., Polyakova V. et al.* Inflammaging of female reproductive system: a molecular landscape. Curr. Aging Sci. 2021; 14(1):10–18.

25. *Tan D.X., Manchester L.C., Esteban-Zubero E. et al.* Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. Molecules 2015; 20:18886–18906.

26. *Tarawneh R., Head D., Allison S. et al.* Cerebrospinal Fluid Markers of Neurodegeneration and Rates of Brain Atrophy in Early Alzheimer Disease. JAMA Neurol. 2015; 72(6):656–665.

Молекулярная патология и клиническая физиология

М.А. Пальцев, И.М. Кветной

Разработка новых технологий в области биологии привела к тому, что медицинская наука перешла на уровень исследований межмолекулярных взаимодействий. Исторически и методологически на рубеже XX-XXI веков возникла молекулярная биомедицина – новая инновационная отрасль медицинской науки и практической медицины, базирующаяся на принципиально новом подходе к болезни и больному, использующая современные профилактические, диагностические и терапевтические подходы, реализуемые на молекулярно-генетическом и клеточном уровнях.

Молекулярная микроскопия: эволюция методологии от функциональной морфологии к клинической физиологии

Фундаментальную основу молекулярной биомедицины представляют исследования, которые убедительно свидетельствуют о том, что выявление общего молекулярного «языка» для обмена сигнальной информацией между клетками, тканями и органами стирает привычные структурно-функциональные границы между тремя классическими регуляторными системами организма – нервной, эндокринной и иммунной.

Многочисленные исследования позволили установить, что эндокринные, нервные и иммунные клетки могут продуцировать одни и те же сигнальные молекулы, которые в одном случае играют роль «классических» гормонов, в другом – нейротрансмиттеров, в третьем – иммуномодуляторов.

Таким образом, был продемонстрирован единый поликомпонентный многоуровневый механизм молекулярной сигнальной регуляции физиологических функций.

Ключевую роль в реализации диагностических и лечебных целей молекулярной медицины играют именно сигнальные молекулы, поскольку различные заболевания возникают из-за нарушений сложного механизма молекулярной регуляции. Поэтому многочисленные сигнальные молекулы могут выступать как в качестве маркеров конкретных заболеваний, так и в качестве мишеней лечебных воздействий.

Развитие молекулярно-генетических методов позволило во второй половине XX века провести специальные медико-демографические исследования на больших популяциях людей различного возраста и живущих в различных районах земного шара, которые показали, что клиническая картина заболеваний и эффективность их диагностики, лечения и профилактики во многом зависит от индивидуальных особенностей организма конкретного пациента, формирующихся на клеточно-молекулярном уровне в процессе его зарождения и последующей жизни.

Именно поэтому в современном мире многие заболевания требуют индивидуального подхода. В связи с этим активное развитие получило новое направление молекулярной биомедицины – персонифицированная (или персонализированная) медицина [1].

В отличие от традиционной терапевтической практики, такой подход не использует стандартные протоколы, рассчитанные на «среднестатистического пациента», а разрабатывает специализированный подход обследования и лечения конкретного больного, проводя для этого детальные углубленные исследования молекулярного профиля его организма [7].

Современные представления о механизмах возникновения и развития заболеваний человека за последние годы значительно расширились – от классических локальных этиопатогенетических представлений до анализа роли и влияния более 5000 биологически активных сигнальных молекул, синтезируемых различными клетками организма [4].

Бурное развитие и широкое внедрение в биомедицину молекулярно-биологических методов верификации экспрессии генов, кодирующих синтез сигнальных молекул (гормонов, цитокинов, ферментов и других факторов), позволили создать новое прикладное направление – молекулярную микроскопию.

Молекулярная микроскопия вобрала в себя накопленные, начиная с середины XX века, представления о функциональной морфологии клеток, тканей и органов.

Основу методологии функциональной морфологии создали активно разрабатываемые, начиная с 40-50-х годов XX столетия, иммуногисто/цитохимические методы исследования, позволившие визуализировать физиологические процессы, протекающие в биологических структурах на любом уровне организации живой материи [4,6,15].

Это позволило превратить морфологию из науки описательной в науку функциональную и изучать процессы жизнедеятельности, базируясь на единой платформе морфологии и физиологии.

Знание нарушений экспрессии конкретных сигнальных молекул, от которых зависит развитие, прогноз и таргетная терапия болезней, значительно расширяет возможности рутинной гистологической диагностики. Молекулярная микроскопия, наряду с другими методологическими возможностями молекулярной физики, химии и биологии, активно способствует развитию клинической физиологии, позволяя повысить объективизацию диагностики, своевременно и точно оценить прогноз заболевания, избрать патогенетический метод лечения социально значимой патологии и разработать для этого современные фармакологические препараты таргетного действия [9].

Персонифицированная медицина и омиксные технологии

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предлагает использовать следующее определение: «Персонализированная медицина – использование новых методов молекулярной диагностики для увеличения эффективности лечения пациентов и определения предрасположенности к тем или иным заболеваниям».

Преимущества персонализированной медицины по сравнению со стандартными диагностическими, лечебными и профилактическими методами следующие. Во-первых, это высокая эффективность лечения, так как терапия подбирается по индивидуальным характеристикам пациента, включая и определение его реакций на те или иные лекарственные препараты, которые могут быть включены в схему его лечения. Во-вторых, в связи с персонализированным подходом у пациента сокращается число побочных эффектов. В третьих, в результате исследования панелей молекулярных биомаркеров возрастает шанс выявления заболеваний на ранних стадиях или предрасположенности к развитию той или иной патологии [10].

В последние годы в связи с бурным внедрением молекулярно-клеточных технологий в биомедицинскую практику особую актуальность для персонализированной медицины приобретают т. н. «омиксные технологии».

Откуда произошел этот термин? В 1920 году немецкий ботаник Ганс Винклер (Hans Winkler) впервые предложил термин «геном» для обозначения совокупности генов, заключенных в хромосомы одного биологического вида.

Еще до Винклера греческий суффикс «-ом», (означающий «имеющий природу») употребляли для создания терминов, например «биом» (совокупность живых организмов) или «ризом» (корневая система растения). Однако только после завершения проекта «Геном человека» и его популяризации в массовой литературе появился целый вал терминов с этим суффиксом – «метаболом», «протеом», «транскриптом» и даже в его уменьшительной форме – геномика», «транскриптомика», «протеомика», «метаболомика» и другие.

Можно спорить о правомочности этих новых терминов, принимать их или не принимать, но они уже стали данностью современной биомедицины в целом и клинической физиологии в частности. Поэтому коротко остановимся на их значении и роли в современной персонализированной медицине.

Геном – совокупность генов, заключенных в хромосомы одного биологического вида. В результате 13-летней кропотливой работы (1990–2003) множества ученых из разных стран по расшифровке человеческого генома было установлено, что человеческий геном состоит из 23 пар хромосом, находящихся в ядре, а также множества копий митохондриальной ДНК.

В ходе выполнения проекта «Геном человека» была определена последовательность ДНК всех хромосом и митохондриальной ДНК. Тщательный анализ показал, что человеческий геном содержит 19 969 активных генов. Расшифровка генома человека привела к появлению специализированных геномных проектов, цель которых – описать работу определенной группы генов, связанных с работой отдельных систем органов или развитием какого-либо заболевания.

Транскриптом – набор всех молекул РНК, которые синтезируются в клетке. Важно подчеркнуть, что несмотря на то что транскриптом является продуктом экспрессии генома, существуют процессы, которые изменяют РНК после транскрипции. Так, например, процесс редактирования РНК распространен очень широко и охватывает более 90% всех мРНК. Кроме того, в составе транскриптома есть не только белок-кодирующие мРНК, но и другие виды РНК – транспортные и регуляторные РНК.

Последовательность нуклеотидов в геноме является постоянной характеристикой организма. Транскриптом же является постоянной характеристикой органа, ткани или отдельной популяции клеток, т. к. разные типы клеток выполняют разные функции и экспрессируют разные гены. Он также может зависеть от условий окружающей среды и меняться во времени.

Протеом – совокупность белков, которые присутствуют в разных клетках и тканях человека в единицу времени. Так как различные клетки в разные моменты времени экспрессируют разные гены, то набор белков в организме будет различаться. Изучить всю совокупность белков человека невероятно сложно, так как белковый пейзаж организма человека необычайно разнообразен (один ген может обеспечивать синтез нескольких вариантов одного белка, которые в дальнейшем могут подвергаться дополнительным биохимическим преобразованиям). Именно поэтому проект «Протеом человека» находится только в начале пути, но перспективы его представляются многообещающими.

Метаболом – совокупность небольших молекул (метаболитов) с молекулярной массой не более 1 кДа. К метаболитам относятся аминокислоты, органические кислоты, сахара, нуклеотиды, небольшие пептиды, например, некоторые гормоны, и другие биологически важные органические вещества – антибиотики, липиды и другие вторичные метаболиты.

В настоящее время все результаты исследования метаболома собираются в единую международную базу данных – «Human Metabolome Database», в которой уже насчитывается более чем 40 000 различных метаболитов. Для каждого метаболита создана учетная запись (т. н. «метаболическая карта»). В ней содержатся сведения о биохимических свойствах метаболита и его значении для выяснения патогенеза заболевания или разработки эффективных лекарственных препаратов.

Таким образом, «омиксные технологии», которые получили свое развитие на основе вышеописанных понятий включают в себя геномику, протеомику и метаболомику.

Анализируя генотип пациента, выявляют его предрасположенность и/или уже имеющиеся заболевания. Затем с помощью изучения протеомных и метаболомных биомаркеров получают сведения о заболеваниях человека на фенотипическом уровне. Различные изменения генотипа человека в онтогенезе могут приводить к развитию заболеваний или повышению предрасположенности к ним.

Значение омиксных технологий для клинической физиологии

Геномика. Активно начинает применяться в онкологии. Фрагменты ctДНК позволяют получить более точную информацию о состоянии опухоли в момент проведения анализа [2]. Это дает возможность следить за динамикой заболевания в процессе лечения. Основная часть фрагментов ctДНК имеет длину 180-200 пар нуклеотидных оснований, что достаточно для того, чтобы определить мутации. Количество частей циркулирующей ДНК зависит от объема всех опухолей в организме человека. Помимо этого, количество фрагментов ctДНК может зависеть от гистологического типа

опухоли, размера опухолевых очагов и от количества новообразовавшихся сосудов, а также от причины гибели раковых клеток. Кроме ctДНК, материалом для исследования могут служить микроРНК, внеклеточные везикулы и циркулирующие опухолевые клетки. Таким образом, с помощью жидкой биопсии можно оценить генетическую гетерогенность всех частей опухоли. Процедура получения жидкой биопсии малоинвазивна и более безопасна, чем обычная биопсия, может проводиться повторно, что дает возможность постоянно отслеживать состояние опухоли при лечении пациента.

Генетические тесты проводятся не только на ДНК, но и на микроРНК. МикроРНК может являться биомаркером патологии кардиомиоцитов и эндотелия, развития фиброза, нарушения ангиогенеза, ишемии миокарда [3]. МикроРНК – это одноцепочечная некодирующаяся молекула РНК, имеющая длину 21-23 нуклеотида. Участок ДНК, кодирующий микроРНК, в большинстве случаев находится между белок-кодирующими генами и имеет самокомплементарный участок, который формирует шпильку на транскрибированной РНК. В ядре эта шпилька отрезается при помощи ферментного комплекса и переносится в цитоплазму. Там с помощью различных белков двухцепочечная шпилька разделяется, «пассажирская» цепь деградирует, а «ведущая» получила название микроРНК. МикроРНК комплементарно связывается с участками мРНК, что приводит к разрушению мРНК и прекращению экспрессии белка.

Согласно базе данных miRBase для человека на сегодняшний день известно более 2,5 тысяч микроРНК (miRNA). МикроРНК играет важную роль в диагностике и определении эффективности лечения рака молочной железы и яичников. Повышение уровня miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-214, miRNA-1346 является биомаркером рака молочной железы, а биомаркером рака яичников – усиление экспрессии miRNA-141, miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-3613 [14].

Протеомика. Также начинает широко использоваться в онкологии. Вследствие гетерогенности злокачественных новообразований существует множество протеомных биомаркеров опухолевой болезни. На данный момент ключевыми биомаркерами опухолей являются молекулы, приведенные в табл. 1.

Помимо вышеперечисленных маркеров, важную роль в диагностике новообразований играет семейство белков-регуляторов апоптоза Bcl-2. Внутри семейства есть как ингибиторы апоптоза (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1 и MCL-1), так и белки, выполняющие проапоптозную функцию (BIM, BID, BAD, NOXA и PUMA).

Таблица 1. Ключевые биомаркеры опухолей

Тип опухоли или её локализация	Биомаркер
Опухоли молочной железы	ER, PR, HER-2
Колоректальная карцинома	EGFR, KRAS, UGT1A1
Опухоли желудка	HER-2, GIST, c-KIT
Опухоли головы и шеи	p53, LOH
Лейкемия и лимфома	CD20, CD30, FIP1L1-PDGRFα, PDGFR, BCR/ABL, PML/RARα, TPMT, UGT1A1
Опухоли печени	AFP, AFLP, DCP
Опухоли лёгких	ALK, EGFR, KRAS
Меланома	BRAF
Опухоли эндометрия и шейки матки	HPV, E6, E7

Исследование биомаркеров оказалось перспективным для диагностики и оценки эффективности лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы [3]. Обнаружено более 100 кардиоспецифических белков, уровни которых значительно изменяются при коронарогенной патологии. Согласно предварительным данным наиболее многообещающими биомаркерами в кардиопротеомике могут служить тропонины, α1-фибриноген, аполипопротеин А1 и С-реактивный белок.

Тропонины – биомаркеры миокардиального стресса. Исследование их уровня используется для диагностики инфаркта миокарда. Аполипопротеин А1 – основной белок липопротеинов высокой плотности, который участвует в транспортировке триглицеридов и обратном транспорте холестерина в печень. Пониженный уровень аполипопротеина А1 является биомаркером атеросклероза и дислипопротеинемии и циррозе печени. С-реактивный белок является биомаркером воспаления при заболеваниях, связанных с атеротромботическими событиями. Он обнаруживается в атероме, бляшках и местах повреждений сосудов. С-реактивный белок принимает участие в образовании тромбов в артериях, что при прогрессии данной патологии приводит к инсульту и инфаркту миокарда.

Помимо исследований биомаркеров в крови, в последние годы все большую популярность приобретает саливадиагностика (выявление биомаркеров в слюне). Основным преимуществом саливадиагностики является неинвазивность этого метода. Возможно многократное получение слюны для отслеживания временной динамики показателей. Полученный материал не требует специальных условий обработки для хранения. В слюне человека обнаружены факторы роста гепатоцитов, фибробластов, нейронов,

эпителиоцитов, тимоцитов, инсулиноцитов, эндотелиоцитов, которые синтезируются клетками стриарных протоков слюнных желез. Также в слюне идентифицированы молекулы, связанные с патологией сердечно-сосудистой системы, онкологическими и метаболическими заболеваниями [5].

Метаболомика. Изучение метаболитов человеческого организма открывает новые возможности для персонализированной медицины. Метаболом – окончательный продукт экспрессии генов. Его изменения влияют на концентрацию ферментов, регуляцию клеточного цикла, контроль сигнальных путей, катаболические и анаболические реакции.

Материалом для исследования метаболитов чаще всего являются кровь или моча, кроме этого можно использовать слюну, секреторные отделения бронхов, поджелудочной железы и другие биологические жидкости и тканевые биопсии.

Так, например, было идентифицировано 84 метаболома сыворотки крови у больных с язвенным колитом и целиакией с помощью методов масс-спектрометрии и газовой хроматографии. Выявлено повышение уровня янтарной кислоты в крови, что подтвердило гипотезу о том, что при язвенном колите гиперсекреция янтарной кислоты повреждает слизистую оболочку кишечника. В группе пациентов, которым во время стандартного лечения давали дополнительно метабиотик (масляная кислота и инулин) наблюдалось нормализация уровня янтарной кислоты.

Благодаря малоинвазивности исследования метаболитов такие исследования можно повторять в течение лечения, чтобы оценить его эффективность. Метаболические анализы позволяют оценить влияние эндогенных и экзогенных факторов, действующих на организм.

Фармакогеномика. Фармакогеномика изучает генетически запрограммированную реакцию людей на лекарственные препараты. Фармакогеномика позволяет увеличить эффективность применения лекарств и свести побочные эффекты к неизбежному минимуму.

В прошлом врачи обращали внимание на негенетические факторы, такие как возраст, питание, сопутствующие заболевания. В настоящее время признано, что большую роль в ответе на терапию играет генетическая предрасположенность. Генетические мутации способствуют изменению структуры ферментов и рецепторов. Следовательно, изменяется метаболическая активность ферментов и сродство рецепторов к препаратам.

Фармакогенетические исследования показали свою эффективность при атеросклерозе, хронической обструктивной болезни легких, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, нейропсихиатрических и онкологических заболеваниях. Так как при онкологических заболеваниях ответ на терапию зависит не только от генотипа индивида, но и от генотипа опухоли, то изучение фармакогеномики опухолей является важной задачей персонализированной медицины.

Примером использования фармакогенетических тестов в клинической практике может служить оценка чувствительности к варфарину и резистентности к клопидогрелу.

Тест на чувствительность к варфарину используется для подбора начальных доз варфарина пациентам с различными видами тромбозов

или тромботических осложнений. Согласно результатам данного теста, разброс дозировок варфарина составляет от 0,7 до 9,8 мг/сут. Благодаря применению теста уменьшается срок подбора препарата, что приводит к снижению кровотечений в 4,5 раза. Известно, что около 25% пациентов являются носителями генотипа CYP2C19, ассоциированных с отсутствием антиагрегантного эффекта клопидогрела, и, следовательно, им необходимо подбирать другой препарат [13].

Кроме того, фармакогеномика исследует как изменяется экспрессия генов при действии лекарственных препаратов. В клинике результатом фармакогеномных исследований является внесение геномных данных в инструкцию к лекарственному препарату. Выявление геномной вариабельности для прогнозирования ответа организма пациента на определенный лекарственный препарат сосредоточено преимущественно на вариации генного кодирования: ферментов, метаболизирующих лекарства, переносчиков лекарств и мишеней их действия. Для предсказания побочных реакций на определенные лекарственные препараты важную роль также играют анализы гаплотипов HLA [8].

В последнее время сахарный диабет по росту распространенности опережает все остальные неинфекционные заболевания. На данный момент известно 10 генов, мутации которых могут вызывать сахарный диабет у детей (тип MODY). Соответственно существует несколько фенотипов такого типа сахарного диабета, что предполагает различное лечение. Таким образом, факмакогеномика позволяет индивидуально подобрать лекарство с максимальным положительным ответом и минимальными побочными эффектами при многих социально значимых заболеваниях [11,12].

Таким образом, молекулярная патология, успешно развивающаяся на основе функциональной морфологии, молекулярной микроскопии и других молекулярно-физических/химических методологических подходах, значительно расширяет клинико-физиологические границы современной персонализированной медицины.

Список литературы

1. *Белушкина Н.Н., Чемезов А.Н., Пальцев М.А.* Персонализированная медицина: от идеи до внедрения в практическое здравоохранение. Молекулярная медицина 2018; 3:9–15. [Belushkina N.N., Chemezov A.N., Paltsev M.A. Personalized medicine: from idea to implementation in practical healthcare. Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine 2018; 3:9–15 (In Russ.)]

2. *Жуков Н.В., Зарецкий А.Р., Лукьянов С.А., Румянцев С.А.* Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия). Перспективы использования в онкологии. Онкогематология 2014; 4:28–36. [Zhukov N.V., Zareckij A.R., Luk'yanov S.A., Rumyancev S.A. Examination of circulating tumor DNA (liquid biopsy). Prospects for use in oncology. Onkogematologiya = Oncohematology. 2014; 4:28–36 (In Russ.)]

3. *Медведева Е.А., Суркова Е.А., Лимарева Л.В., Щукин Ю.В.* Молекулярные биомаркеры в диагностике, стратификации риска и прогнозировании хронической сердечной недостаточности. Российский кардиологический журнал 2016; 8(136):86–91. [Medvedeva E.A., Surkova E.A., Limareva L.V., Shchukin Yu.V. Molecular biomarkers in the diagnosis, risk stratification and prediction of chronic heart failure. Rossijskij kardiologicheskij zhurnal = Russian Journal of Cardiology 2016; 8(136):86–91 (In Russ.)]

4. *Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др.* Сигнальные молекулы: место и роль в персонифицированной диагностике, лечении и профилактике социально значимых заболеваний. Молекулярная медицина 2012; 5:3–8. [Paltsev M.A., Kvetnoj I.M., Polyakova V.O. et al. Signal molecules: place and role in personalized diagnosis, treatment and prevention of socially significant diseases. Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine 2012; 5:3–8 (In Russ.)]

5. *Пальцев М.А., Сараев Г.Б., Бунин В.А. и др.* Слюна как биологический объект для неинвазивной молекулярной диагностики сердечно-сосудистых заболеваний. Молекулярная медицина 2018;16(5):3–8. [Paltsev M.A., Saraev G.B., Bunin V.A. et al. Saliva as a biological object for non-invasive molecular diagnostics of cardiovascular diseases. Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine 2018;16(5):3–8 (In Russ.)]

6. *Cheung A.H., Chow C., To K.F.* Latest development of liquid biopsy. Journal of Thoracic Disease 2018;10:1645–1651.

7. *Di Paolo A., Sarkozy F., Ryll B., Siebert U.* Personalized medicine in Europe: not yet personal enough? BMC Health Serv Res 2017; 17(1):289.

8. *Ehmann F., Caneva C., Prasad K. et al.* Pharmacogenomic Information in Drug Labels. European Medicines Agency perspective. Pharmacogenomics J. 2015; 15(3):201–210.

9. *Foroutan B.* Personalized medicine: a review with regard to biomarkers. Journal of Bioequivalence & Bioavailability 2015; 7(6):244–256.

10. *Ingelman-Sundberg M.* Personalized medicine into the next generation. Journal of Internal Medicine 2015; 277:152–154.

11. *Johnson J.A.* Pharmacists should jump onto the clinical pharmacogenetics train. Am J Health Syst Pharm. 2016; 73(23):2013–2016.

12. *Maliepaard M., Nofziger C., Papaluca M. et al.* Pharmacogenetics in the evaluation of new drugs: a multiregional regulatory perspective. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(2):103–115.

13. *Mini E., Nobili S.* Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism 2009;6(1):17–24.

14. *Panoutsopoulou K., Avgeris M., Scorilas A.* MiRNA and long non-coding RNA: molecular function and clinical value in breast and ovarian cancers. Expert of Molecular Diagnostics 2018; 18(11):963–979.

15. *Raschella G., Melino G., Gambacurta A.* Cell death in cancer in the era of precision medicine. Springer Nature. 2018; 20(7): 529–538.

Глава 13. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков

Понятие «клинический» относительно конкретной науки означает лишь то, что объектом изучения, исследуя который данная наука своими методами решает свои задачи, является больной организм. В этом заложен двойной смысл. С одной стороны, больной организм, с точки зрения врача, представляет собой объект, требующий помощи, лечения. С другой стороны, патофизиолог (общий патолог) исследует, как формируется патология, фармаколог расшифровывает механизмы действия лекарственных препаратов, психолог выясняет закономерности психической деятельности.

С точки зрения физиолога, больной организм – это модель нарушений функций, по которым можно сделать заключения, как они осуществляются в нормальном (здоровом) организме. Патофизиолог (общий патолог) исследует, как формируется патология, а фармаколог расшифровывает механизмы действия лекарственных препаратов.

Задача физиологии – изучение функций здорового (нормального) организма.

Общая физиология (экспериментальная физиология, фундаментальная физиология) для ее решения в качестве объекта исследования использует здоровый организм (животного и человека).

Методы исследования

Наблюдения – определение физиологических показателей у животных в разных условиях обитания (равнинные животные и высокогорные) – классический представитель – Слоним А.Д., П. Бэр.

Эксперимент (лат. eksperimentum – проба, опыт) – активное воздействие на природу или искусственное воспроизведение ее различных явлений с целью познания объективных закономерностей. Эксперимент представляет собой одну из форм практической проверки теоретических построений, методик, технологий, создаваемых человеком на основе наблюдений и накопленных знаний.

С этих позиций все, что мы называем испытанием (в том числе и в клинике) – это эксперимент. Полет в космос, подъем в горы, первое применение препарата, первая операция – это эксперимент.

Эксперименты на себе

Леон Абгарович Орбели, который предпринял в 1933 и 1938 годах два опыта на себе по изучению действия гипоксии в 1933 в барокамере и в 1938 на подводной лодке.

Эксперименты В.В. Парина, В.Г. Черниговского и А.П. Полосухина в Свердловском медицинском институте. На себе проводили эксперименты по пережатию сонной артерии, по действию болевых факторов, гипотермии и газового наркоза.

Чумаков М.П. в 1958–1959 гг. лично испытал «живую вакцину» против полиомиелита на себе и своих детях.

В 2005 году Уоррен и Маршалл за свои работы по Helicobacter pylori получили Нобелевскую премию. Для доказательства предположения, что причиной гастрита и язвы желудка является бактерия *Helicobacter pylori*, Барри Маршал выпил содержимое чашки Петри с культурой этих бактерий, из-за чего у него развился гастрит.

Эксперименты на других людях

Принудительно

Нацистскими врачами было проведено более 60 тысяч опытов над узниками концентрационных лагерей.

На Нюрнбергском процессе (1947 г.) перечень преступлений врачей-убийц зачитывали несколько дней. Согласно приговору международного трибунала, 15 из 23 подсудимых были признаны виновными. В приговор был включен раздел, названный «Допустимые медицинские эксперименты», который впоследствии получил известность как Нюрнбергский кодекс – первый международный документ, регламентирующий проведение медико-биологических экспериментов на человеке.

«Отряд 731» был организован в целях подготовки бактериологической войны. Изучались пределы выносливости человеческого организма в определенных условиях – например, на больших высотах или при низкой температуре.

Бомбардировка американцами Хиросимы и Нагасаки – это массовый эксперимент по действию ионизирующей радиации на организм человека. По воспоминаниям генерала Гровса, эти города специально не подвергались авианалетам во время войны.

В СССР проводились испытания новых видов отравляющих веществ, ядерного и бактериологического оружия на военнослужащих в «добровольно-принудительном» порядке. Наибольшую известность получили данные по Тоцкому полигону, когда маршал Г.К. Жуков послал войска на преодоление зоны радиационного поражения.

На добровольцах

Российский ученый Илья Иванович Иванов проводил опыты над людьми, пытаясь вывести гибрид человека и обезьяны.

В 50-70-е г.г. в СССР при подготовке полета человека в космос предельные нагрузки на качелях Хилова, гиподинамия, центрифуга, сурдокамера, голодание и другие опыты проводились на «штатных испытателях». Исследования опирались преимущественно на энтузиазм и патриотизм испытуемых, информирование о рисках, последствиях было ограниченным. Многие испытатели «первой волны» были уволены без льгот, пособий, некоторые по инвалидности. Засекреченность экспериментов препятствовала впоследствии испытателям получать законную компенсацию за нанесенный ущерб здоровью.

Нет ни одной фармацевтической компании, которая бы не проводила эксперименты на людях.

Спонтанные эксперименты (аварии)

29 сентября 1957 года в 16:22 на предприятии «МАЯК» (Челябинская область) из-за выхода из строя системы охлаждения произошел взрыв емкости объемом 300 кубических метров, где содержалось около 80 м³ высокорадиоактивных ядерных отходов. В зоне радиационного загрязнения оказалась

территория нескольких предприятий комбината «Маяк», военный городок, пожарная часть, колония заключенных и далее территория площадью 23 000 км² с населением 270 000 человек в 217 населенных пунктах трех областей.

Март 1979 год – выброс спор сибириязенных бактерий в лаборатории военного института города Свердловска.

26 апреля 1986 года – разрушение четвертого энергоблока Чернобыльской атомной электростанции.

Задачи клинической физиологии – изучение функций здорового (нормального) организма.

Объект исследования – больной организм (животного и человека), который рассматривается как экспериментальная модель выпадения (если функция органа отсутствует) или раздражения (если она повышена). Однако решается вопрос о том, как работает орган в норме. По гипер- и гипотиреозу определяют, какие гормоны и биологически активные вещества железа вырабатывает в норме и какие процессы регулирует (т. е. аналогично удалению, или подсаживанию железы, или введению гормонов).

Кроме того, клиническая физиология ставит задачу определения, насколько данные, полученные на животном, можно перенести на человека. Никакие математические подходы решить этот вопрос неспособны.

Первоначально просто эксперименты на животных повторяли на людях. Примером могут служить эксперимиенты ученика и сотрудника И.П. Павлова – Никола́я Ива́новича Красного́рского – советского физиолога и педиатра, академика АМН СССР (1945), заслуженного деятеля науки РСФСР (1944), лауреата премия им. Павлова АН СССР (1942) и Сталинской премии (1952). Он использовал метод условных рефлексов для изучения функций мозга у здоровых и больных детей. Применял фистулу слюнных желез у беспризорников, что зафиксировано в его трудах и фильме, снятом В. Пудовкиным в 1925 году, «Механика головного мозга» об учении и опытах Ивана Петровича Павлова.

Затем пришли к выводу, что больной человек в определенной степени может быть аналогом экспериментальной модели.

При выявлении несоответствия между данными эксперимента и клиники – определяет цели и задачи исследований для общей физиологии.

Клиническая физиология также предоставляет модели, которые невозможно создать в эксперименте, при этом задает вектор к разработке новых методических приемов. Так, в эксперименте нельзя воспроизвести наследственные (и психические?) заболевания, но на основе их изучения выведены линейные животные, нокаутные, трансгенные, гуманизированные животные.

Клиническая физиология – использование физиологических механизмов в восстановлении гомеостаза или перевода его в гетеростаз.

Согласно приведенным выше критериям, можно выделить иммунофизиологию, которую можно разделить на общую (фундаментальную) и клиническую.

Задача иммунофизиологии – изучение роли иммунной системы в регуляции функций здорового (нормального) организма.

Общая иммунофизиология. Сама иммунология (иммунофизиология) вышла именно из клинической физиологии, когда стало ясно, что при всем разнообразии инфекционной патологии в защите от инфекции есть нечто общее. Старанием И.И. Мечникова и П. Эрлиха появилась иммунология как форма противоинфекционной защиты. С развитием трансплантологии иммунную систему стали рассматривать как строгого цензора, или «полицейского». или часового, который по паролю (генетическому коду) отличает своих от чужих. Постепенно функции иммунной системы расширялись, и сегодня формируется представление, что иммунная система, подобно рачительной домохозяйке, следящей за порядком в доме, при поддержании гомеостаза в организме своевременно подлатает то, что сломалось, вовремя вынесет мусор, при непогоде выставит защитный экран, а при вторжении агрессивного чужака спустит с цепи сторожевых собак. Основные положения концепции иммунофизиологии были нами сформулированы в 2002 году [1]. В последние годы интенсивное развитие получило новое научное направление, находящееся на стыке нескольких дисциплин: медицины, иммунологии, нейробиологии – и касающееся изучения факторов гуморального иммунитета – естественных антител. Естественные антитела (Е-АТ) – иммуноглобулины, которые продуцируются нормальными В-клетками в отсутствие антигенной стимуляции. Главное функциональное отличие естественных от адаптивных антител – это способность первых осуществлять регуляторные, гомеостатические функции организма.

Еще в 1947 г Grabar P. выдвинул гипотезу, согласно которой в нормальном организме присутствуют Е-АТ, выполняющие не только иммунологическую, но и физиологическую защитную функцию, направленную на поддержание внутреннего гомеостаза. Он показал, что Е-АТ, связанные с поврежденными или разрушенными тканями и клетками, могут принимать на себя **функцию транспортеров продуктов обмена веществ,** если в организме ослаблен ферментативный катаболизм [2]. Транспортная функция Е-АТ, поддерживающая гомеостаз, показана в отношении ряда соединений: миоглобина, высвобождающегося в кровь при физических нагрузках; «состарившихся» молекул сывороточного альбумина, накапливающихся при острых поражениях печени; фибриногена и тромбина при гиперкоагуляционных состояниях [3, 4].

Связываясь с собственными компонентами, которые изменяются в процессе старения, Е-АТ способствуют клиренсу катаболитов [5, 6].

Е-АТ выполняют и функцию защиты регуляторных молекул. Так, Ауто-Е-АТ, синтезируемые в организме здоровых лиц и взаимодействующие с биологически активными факторами пептидной природы (инсулин, цитокины), могут предохранять эти лабильные соединения от преждевременной протеолитической деградации и обеспечить доставку этих молекул к специализированным участкам клетки, где происходит специфическое высокоаффинное связывание [7].

Протекторная роль антител в этом случае проявляется не только в экранировании пептидов от атаки протеолитических ферментов, но и в предотвращении их неэффективного диффузного «размазывания» по множеству участков низкоаффинного неспецифического связывания, имеющихся на поверхностных мембранах многих клеток в разных тканях. В результате

протекторного действия соответствующих антител биологическая эффективность действия таких пептидных медиаторов значительно возрастает.

Существенна роль иммунной системы в **обеспечении тканевого гомеостаза**. Так, Е-АТ могут индуцировать **механизм программированной клеточной гибели (апоптоза)** как нормальных, так и малигнизированных клеток. Недавно было показано, что Е-АТ способны связываться с апоптотическими тельцами и содействовать их поглощению дендритными клетками, предотвращая развитие аутоиммунных процессов [8, 9].

В то же время известны данные, когда антитела, напротив, блокируют апоптоз и предотвращают программированную клеточную гибель [10].

Регенерация. Если у мышей с поврежденными скелетными мышцами создать искусственный дефицит макрофагов, мышечная ткань восстановится плохо, зато в большом количестве образуются фиброзные рубцы [11].

Известно, что у млекопитающих поврежденные ткани никогда не восстанавливаются полностью – вместо отрубленного пальца никогда не вырастает новый. В то же время аксолотль (*Ambystoma mexicanum*, способная к размножению личинка амбистомы, близкого родственника настоящих саламандр) легко восстанавливает конечности после ампутации. Однако при снижении в их организме количества макрофагов почти до нуля при повторных инъекциях клодроната, регенерация конечности полностью блокируется: рана затягивается, но вместо лапы образуется покрытая шрамами фиброзная культя, как и у млекопитающих. После же восстановления содержанитя макрофагов в организме ампутация культи приводит в восстановлению полноценной конечности [11].

Скорость (темп) регенерации мышц, поврежденных кардиотоксином у мышей с дефицитом гена Cbl-b зависит от функционального состояния макрофагов [12].

В настоящее время выделяют несколько типов макрофагов, регулирующих регенерацию: провоспалительные, профибротические, противовоспалительные и антифибротические [13].

Выбраковка неполноценных клеток в процессе обновления ткани (например, неэффективные эритропоэз и лейкопоэз в кроветворной ткани) [14].

Гемопоэтические островки. Эритробластные островки (ЭО), открытые более 60 лет назад, представляют собой специализированную микросреду для эритропоэза. Этот островок состоит из центрального макрофага с окружающими его развивающимися эритроидными клетками. Макрофаги EBI вызвали большой интерес для проверки гипотезы поддержания эритропоэза. Макрофаги EBI экспрессируют рецептор эритропоэтина (Epor) как у мыши, так и у человека, и Еро действует как на эритроидные клетки, так и на макрофаги EBI одновременно в нише, тем самым способствуя эритропоэзу. Нарушенная передача сигналов Epor в макрофагах значительно ингибирует дифференцировку эритроидных предшественников. Более того, накопленные данные свидетельствуют о том, что дисфункция макрофагов EBI может приводить к определенным эритроидным нарушениям эритроидного ростка [15].

Старение. С помощью механизма образования комплексов Е-АТ-антиген с участием анти-Galα1-3Gal IgG у человека удаляются собственные

стареющие эритроциты из кровотока, но не за счет фагоцитоза макрофагами. Кроме того, Е-АТ влияют на дифференцировку и активацию Т-, В- и дендритных клеток [9, 16, 17].

Как отмечалось выше, связываясь с собственными компонентами, которые изменяются в процессе старения, Е-АТ способствуют клиренсу катаболитов [5, 6].

Проявление иммунорегуляторной активности показано в отношении Е-АТ к **ДНК.** Из препаратов иммуноглобулина для внутривенных инъекций выделяли свободные Е-АТ к ДНК с помощью аффинной хроматографии, а также исходно блокированные (скрытые) анти-ДНК-антитела сочетанием методов ионообменной и аффинной хроматографии [18,19]. Свободные антитела к ДНК взаимодействовали с поверхностью тимоцитов (в связывании участвовали 5-6% клеток), не вызывая их повреждения, тогда как скрытые анти-ДНК-Е-АТ реагировали с 65% тимоцитов, повреждая их мембраны и вызывая гибель клеток. Кроме того, ауто-Е-АТ IgG-класса, прежде всего направленные к ядерным и цитоплазматическим антигенам (РНК, ДНК и др.), способны проникать внутрь клетки с помощью рецепторов FcγR и эндоцитоза. Определенные ауто-ЕАТ способны проникнуть в аутореактивные В-клетки и стать причиной их апоптоза или некроза. Это один из механизмов поддержания аутоиммунной толерантности в норме [20].

Естественные антитела (Е-АТ) являются важным компонентом системы врожденного иммунитета. Avreameas S. предложил гипотезу, рассматривающую естественный иммунитет как гомеостатическое равновесие между Е-АТ и их разнообразными мишенями [21, 22, 23]. Основным тезисом этой гипотезы является положение о том, что введение определенного количества чужеродного антигена (АГ) или повышение концентрации эндогенных антигенов (в силу различных причин) может привести к временному или хроническому нарушению гомеостаза иммунной системы. Временное нарушение служит причиной возникновения моноспецифических антител, тогда как хронический процесс приводит к развитию иммунопатологических состояний. Механизм развития указанных процессов определяется взаимодействием полиспецифических рецепторов В-клеток с различными АГ. Такое взаимодействие может индуцировать серию мутаций и делений В-клеток, ведущих к синтезу высокоспецифичных АТ для определенного антигена. Е-АТ выполняют ряд важных защитных регуляторных, а при определенных условиях, патофизиологических функций.

Клиническая иммунофизиология

Исследования состояния иммунной системы у больных в клинике обнаруживают целый ряд чисто физиологических проблем, которые часто выпадают из поля зрения исследователей, работающих в области фундаментальной физиологии.

Поскольку **ионные каналы** – это порообразующие мембранные белки, которые позволяют ионам проходить через пору канала и их функции включают установление мембранного потенциала покоя, формирование потенциалов действия и других электрических сигналов путем стробирования потока ионов через **клеточную мембрану**, то и их состояние зависит от наличия вырабатывающихся на них антител. То же относится и к рецепторам.

У больных, страдающих синдромом Ламберта-Итона (одна из форм неврологической (нервно-мышечной) патологии) выявлена избыточная продукция естественные **антител [**18], которые **влияют на функции ионных каналов мембраны** [24, 25].

Миастения – классическое аутоиммунное заболевание, клинические проявления которого в виде слабости и патологической мышечной утомляемости обусловлены повреждающим действием поликлональных антител к различным структурам нервномышечного синапса и мышцы. Определение сывороточных антител к различным синаптическим и внесинаптическим мишеням при миастении является важным инструментом в клинической практике врача, сталкивающегося с этим заболеванием [26].

Эти клинические наблюдения ставят вопрос об иммунологической регуляции передачи электрического сигнала (потенциала действия) и формировании ансамблей нервных клеток типа доминанты, генератора патологически усиленного возбуждения.

По современным научным представлениям, антитела к нейромедиаторам рассматриваются как фактор обратной связи взаимодействия ЦНС и иммунной системы [2, 6]. С помощью антител специфичных к нейромедиаторам происходит иммуномодуляция активности системы болевой проводимости [27].

Исследования в области нейроиммунного взаимодействия показывают, что при развитии ряда заболеваний могут происходить изменения гуморального иммунитета, связанные с продукцией естественных антител (е-Ат), специфичных к эндогенным биорегуляторам [28, 29]. В частности, существует тесная взаимосвязь механизмов регуляции болевой чувствительности и работой иммунокомпетентных клеток организма. У больных с дорсопатией поражена периферическая нервная система [30]. Многочисленные исследования механизмов реализации патологической боли и ее торможения позволили установить, что периферические сенсорные нейроны экспрессируют опиатные рецепторы, функции которых модулируют эндогенные опиаты, высвобождаемые различными иммунными клетками и сенсорными нейронами [31, 32, 33].

На участии иммунных механизмов в формировании долговременной памяти основана предложенная И.П. Ашмариным теория памяти [34].

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) – это полигенное многофакторное заболевание, в основе которого лежит иммуноопосредованная или идиопатическая деструкция β-клеток поджелудочной железы, приводящая к абсолютной инсулиновой недостаточности.

Это указывает на участие иммунной системы в регуляции эндокринного контроля функций и в физиологических условиях – она **принимает участие в гашении горнонального сигнала**.

Тот факт, что инволюция лимфоидной ткани коррелирует с повышением резистентности организма при стрессе (триада Селье), а ее гиперплазия – тимико-лимфатический статус с внезапной детской смертью дает основание для изучения роли иммунной системы **в формировании реактивности и резистентности организма** к действию экстремальных факторов, которая представляется более широкой и многообразной нежели видится с позиций иммунитета и иммунологической реактивности.

Существенна роль иммунной системы в **обеспечении тканевого гомеостаза**. Так, Е-АТ могут индуцировать **механизм программированной клеточной гибели (апоптоза)** как нормальных, так и малигнизированных клеток Недавно было показано, что Е-АТ способны связываться с апоптотическими тельцами и содействовать их поглощению дендритными клетками, предотвращая развитие аутоиммунных процессов [35, 36].

В то же время известны данные, когда антитела, напротив, блокируют апоптоз и предотвращают программированную клеточную гибель [10].

Достижение постоянства клеточного состава ткани – основной положительный результат функционирования иммунной системы. С этих позиций к ней вполне применимы принципы, сформулированные П.К. Анохиным для функциональных систем, а саму ее можно рассматривать как функциональную систему гомеостатического уровня в ряду с системами, контролирующими уровень питателных веществ, газов, осмотического давления, pH, кровяного давления, температуры, содержания физиологически активных веществ: гормонов, олигопептидов и т. д. [37].

Антигенпрезентирующие клетки выполняют еще одну чрезвычайно важную функцию. Через них иммунная система вовлекается в формирование новых функциональных систем, обеспечивающих адаптацию организма к изменяющимся условиям [1].

Эффект влияния иммунной системы на физиологические функции организма подчиняется закону Арндта-Шульца (1888), устанавливающего зависимость ответной реакции от силы действия, сущность которого – в двусторонности действия каждого раздражителя в зависимости от дозы: в малых дозах раздражение дает стимулирующий, а в больших дозах – обратный, депрессирующий эффект.

Это убедительно доказал А.А. Богомолец, показавший, что малые дозы цитотоксических стимулируют, а большие угнетают функции органов, к клеткам которых они получены [38].

Клиническая иммунофизиология предоставляет модели, которые невозможно воспроизвести в эксперименте, но можно использовать для расшифровки механизмов функционирования иммунной системы в физиологических условиях.

Так, ВИЧ представляет собой модель избирательного тотального выключения (синдром выпадения) иммунной системы (другие воздействия – ионизирующая радиация, цитостатики и др. действуют и на другие клетки, а вирус только на клетки иммунной системы), аллергия повышенной реакции системы (синдром раздажения), а цитокиновый шторм – модель тотальной дисфункции иммунной системы.

В последние годы развивается еще одно направление клинической физиологии – **использование иммунофизиологических механизмов в восстановлении гомеостаза или перевода его в гетеростаз.**

Начало этих исследований лежит в работах А.А. Богомольца, который получал цитотоксические сыворотки к различным органам и тканям (самая известная из которых – антиретикулярная цитотоксическая сыворотка – АЦС) и, используя большие и малые их дозы, воздействовал на функции органа [38].

Другое направление – иммунотоксины. Иммунотоксины сочетают в себе

специфичность терапии антителами с убивающей клетки способностью некоторых из наиболее токсичных природных белков. Они представляют собой химерные молекулы, которые состоят из белкового токсина, слитого с целевым фрагментом. Целевой домен чаще всего представляет собой антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела. Антитело доставляет токсин в раковую клетку, затем токсин проникает внутрь и убивает клетку.

Иммунотоксины («конъюгат антитело-препарат» или «конъюгат антитело-лекарственное средство», **англ. Antibody-drug conjugate, ADC**) – новый **класс лекарственных средств, предназначенный для направленного лечения онкологических заболеваний** – представляют собой новый класс терапевтических средств, конъюгированных с антителами. Они состоят из нацеливающего домена на основе антител, ***химически присоединенного к высокотоксичному терапевтическому агенту*** (бактериальному токсину, цитостатику, радиоизотопу, наночастицей). Целевой домен чаще всего представляет собой антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела. Антитело доставляет токсин в раковую клетку, затем токсин проникает внутрь и убивает клетку.

Первое успешное применение иммунотоксина in vivo было описано в журнале Nature в 1981 году [39].

Моноклональные антитела также могут быть помечены радиоактивными агентами для использования в качестве противораковых терапевтических средств. Эта стратегия концентрирует терапевтическую радиоактивность в очагах заболевания. Однако, поскольку радиоактивный груз не требует интернализации клеток для своей активности, эти агенты оказывают значительное токсическое воздействие на соседние неопухолевые, радиочувствительные ткани.

В настоящее время разрабатываются методики получения обычных моноклональных и инженерных антител или нанотел против внеклеточных петель ионных каналов [40].

На рынке имеется более 60 одобренных к клиническому применению антител для лечения онкологических, аутоиммунных и воспалительных заболеваний, и еще приблизительно 550 находятся на различных стадиях клинических испытаний [41].

Заключение. Вопрос о взаимоотношении физиологии и клинической медицины поднимается постоянно. К нему обращались и А.А. Богомолец [38], и Ю.В. Наточин [42]. Эта проблема в полном объеме затрагивает и такую область физиологии как иммунофизиология. Фундаментальная (экспериментальная, теоретическая) иммунофизиология и клиническая иммунофизиология представляют две ветви одной науки, решают одни и те же задачи. Различия в них лишь в объектах исследования: в первом случае это здоровый организм человека или животного, а во втором – больной. Они могут существенно и весьма эффективно дополнять друг друга. По существу, в силу абсолютной неповторимости и уникальности каждого клинического случая и сама болезнь есть своеобразный эксперимент, поставленный природой [43]. Интеграция знаний, накопленных по каждому из направлений, привело к новой оценке физиологической роли иммунной системы в норме и при патологии.

Список литературы

1. *Черешнев В.А., Юшков Б.Г. и др.* Иммунофизиология. Екатеринбург: УрО РАН. 2002; 260.
2. *Grabar P.,* Hypothesis. Autoantibodies and immunological theories: an analytical review. Clin. Immunol. Immunopathol. 1975; 4: 453.
3. *Avrameas S., Guilbert B., Dighiero G.,* Natural antibodies against tubulin, actin, myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 1981; 132: 231.
4. *Baumgarth N., Tung J.M., Herzenberg L.A.,* Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Seminars in Immunopathology. 2005; 26(4): 347 –362.
5. *Lutz H.U., Stammler P., Jelezarova K. et al.,* High doses of immunoglobulin G attenuate immune aggregate-mediated complement activation by enhancing physiologic cleavage of C3b in C3bn- IgG complexes. Blood. 1996; 88(1): 184–193.
6. *Hintner H. Romani N., et al.,* Phagocytosis of keratin filament aggregates following opsonization with Ig anti- keratin filament autoantibodies. J. Invest. Dermatol. 1987; 88: 176.
7. *Полетаев Ф.Б.,* Иммунофизиология и иммунопатология. М.: МИА. 2008; 208.
8. Elluru S.R. et al., Modulation of human dendritic cell maturation and function by natural IgG antibodies. Autoimmun Rev. 2008; 7(6): 487–90.
9. *Lleo A., Invernizzi P., et al.,* Definition of human autoimmunity − autoantibodies versus autoimmune disease. Autoimmun Rev. 2010; 9(5): 259–66.
10. *Nevinsky G.A., Buneva V.N.* Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. J. Cell. Mol. Med. 2003; 7(3): 265–76.
11. *Godwin J.W., Pinto A.R., Rosenthal N.A.,* Macrophages are required for adult salamander limb regeneration, PNAS. 2013; 110 (23), 9415–9420.
12. *Kohno S., Ueji T., et al.,* Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl-b-deficient mice. Muscle Nerve. 2011; 43(2):223–9.
13. *Wynn T.A, Vannella K.M.* Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity. 2016; 44(3). 450–462.
14. Патологическая физиология: учеб. пособ. для студент. учрежд. высш. образов. … в 2 ч. / Под ред. Н.Е. Максимович [и др.]. Гродно: ГрГМУ, 2020; 312.
15. *Li W., Guo R., et al.,* Erythroblastic island macrophages shape normal eerythropoiesis and drive associated disorders in erythroid hematopoietic diseases. 2021;8: 613885.
16. *Ochsenbein A.F., Zinkernagel R.M.,* Natural antibodies, complement link innate, and acquired immunity. Immunology Today. 2000; 21(12): 624–630.
17. *Vani J., Elluru S. et al.,* Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. Autoimmun. 2008; 7(6): 440–4.
18. *Мягкова М.А.,* Естественные антитела к низкомолекулярным соединениям. М.: МГУЛ, 2001; 268.
19. *Мягкова М.А., Панченко Л.Ф.,* Естественные антитела к эндогенным биорегуляторам в патогенезе наркомании. Наркология. 2002; 10: 31–45.
20. *Alarcón-Segovia D., Llorente L.,* Ruíz-Argüelles A., Autoantibodies that penetrate into living cells. Autoantibodies. Elsevier Science. 1996; 96–102.
21. *Awameas S., Dighiero G., et al.,* Studies on natural antibodies and autoantibodies. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 1983; 134: 103.

22. *Awameas S.,* Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. Immunol Today.1991; 12: 154.

23. Avrameas S., Ternynck T., Natural autoantibodies: the other side of the immune system. Res. Immunol.1995; 146: 235.

24. *Guilhert B., Dighiero G., Avrameas S.,* Naturally occuring antibodies against nine common antigens in normal human sera. I. Detection, isolation, and haracterization. J. Immunol. 1982; 128: 2779.

25. *Poletaev A.B., Stepanyuk V.L., Gershwin M.E.,* Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity. Autoimmun Rev. 2008; 30: 68–73.

26. *Дедаев С.И.,* Антитела к аутоантигенным мишеням при миастении и их значение в клинической практике. Нервно-мышечные болезни. 2014; 2: 6–15.

27. *Манжуло И.В., Дюйзен И.В.,* Нейрохимические изменения в ростральном вентромедиальном ядре продолговатого мозга крысы при развитии нейропатического болевого синдрома. Нейрохимия. 2015; 3: 259.

28. *Петроченко С.Н., Боброва З.В. и др.,* Определение антител к эндогенным биорегуляторам для оценки функционального состояния здоровья спортсменов. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(6):346.

29. *Пальцев М.А., Полетаев А.Б., Сучков С.В.,* Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии. Вестник РАМН. 2010; 8: 1.

30. *Голубев В.Л., Вейн А.М., Данилов А.Б.,* Гендер и боль. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2005; 105(10): 72.

31. *Hegadoren K.M., O'Donnell T., Lanius R. et al.,* The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. Neuropeptides. 2009; 43(5): 341.

32. *Игонькина С.И., Кукушкин М.Л. и др.,* Антитела к нейромедиаторам антиноцицептивной системы усиливают и пролонгируют невропатическую боль. Российский журн. боли. 2014; 1(42):15.

33. *Williams F.M., Scollen S., Cao D. et al.,* Genes contributing to pain sensitivity in the normal population: an exome-sequencing stud. PLoS Genet. 2012; 12(8): 1.

34. *Ашмарин И.П., Бородкин Ю.С., Бундзен П.В.,* Механизмы памяти. Наука. 1987; 216.

35. *Elluru S.R. et al.,* Modulation of human dendritic cell maturation and function by natural IgG antibodies. Autoimmun. Rev. 2008; 7(6): 487–90.

36. *Lleo A., Invernizzi P., et al.,* Definition of human autoimmunity − autoantibodies versus autoimmune disease. Autoimmun. Rev. 2010; 9(5): 259–66.

37. *Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Черешнева М.В.,* Иммунная система с позиции теории функциональных систем П.К. Анохина. Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Воронеж: Издательство «Истоки». 2017; 69.

38. *Богомолец А.А.,* Основные направления моих работ. В кн.: Александр Александрович Богомолец. Воспоминания современников. К., 1982 ; 14–32.

39. *Blythman H., Casellas P., et al.,* Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. Nature. 1981; 290(5802): 145–6.

40. *Wulff H., Christophersen P., et al.,* Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels. Nat. Rev. Drug Discov. 2019; 18: 339–357.

41. *Carter P.J., Lazar G.A.,* Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. Nat. Rev. Drug Discov.2018; 17: 197–223.

42. *Наточин Ю.В.,* Физиология и медицина. Послесловие к научной сессии «Наука – здоровью человека» Общего собрания РАН и РАМН. Вестник Российской академии наук. 2004; 74(11); 973–986.

43. *Багров Я.Ю.,* Клиническая физиология: выдумка или реальность? Нефрология. 2001; 5(1): 104–106.

Глава 14. МИКРОБИОМ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

В.К. Ильин, С.В. Черкасов

Введение

В организме человека обитают разнообразные микроорганизмы, формирующие сообщества различных участков тела (биотопов), которые сильно различаются по их составу и функциям. Видовой состав, количество микроорганизмов и микробное разнообразие варьируют в зависимости от морфологических и физиологических особенностей биотопа и коррелируют с индивидуальным состоянием здоровья, диетой, гигиеной [110]. Человек впервые приобретает значительное количество микробиоты от матери во время родов. Микробный состав очень динамичен и постоянно меняется в течение первых трех лет жизни, после этого становится относительно стабильным, но изменения происходят постоянно на протяжении всей жизни [45, 55].

Термин **микробиота человека** используется для описания сообщества из 100 триллионов микроорганизмов (около 1000 видов, в основном бактерий, а также вирусов, архей, грибов и простейших), колонизирующих наш организм [55, 60, 68, 72, 114, 115, 127]. Самая большая микробная популяция находится в кишечнике человека. Общий вес кишечных микроорганизмов у человека составляет до 1,5 кг [107].

Нобелевский лауреат Джошуа Ледерберг использовал термин «**микробиом**», чтобы определить сложные экологические сообщества симбиотических, комменсальных и патогенных микроорганизмов, обитающих в организме человека [55, 84]. Кроме того, микробиом характеризует совокупность генов микроорганизмов, обитающих в биотопе, и представляет собой «коллективный геном» [55, 114, 115]. Микробиом кодирует примерно в 100 раз больше генов, чем весь геном человека [62, 114, 120]. Микробиота рассматривается как крупнейшая «диффузная система органов» в организме человека, но важнее ее метаболическая активность, которая больше, чем у печени и поддерживает многие жизненные процессы [70]. Поэтому организм человека вместе с его микробиотой описывают как **суперорганизм** или **холобионт**, функционально объединяющий в себе генетически разнородные клетки и возникший в результате **симбиоза** с микроорганизмами. В этом смысле люди не уникальны, все эукариоты имеют симбионтных прокариот [57, 81]. Микробиомы различных биотопов, включая кожу, ротовую полость, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, мочевыводящие пути, половые пути, продуцируют тысячи метаболитов, которые играют важную роль как в физиологии человека, так и в развитии болезней [55, 114]. Подавляющее большинство наших симбионтных микроорганизмов просто необходимы, т. к. они обеспечивают критические метаболические, физиологические, регуляторные и защитные функции хозяина (например, колонизационная резистентность) [125].

Так, микробиота обеспечивает ферментацию неперевариваемых компонентов пищи в усвояемые метаболиты, связывание токсических соединений, антагонизм к патогенам, укрепление кишечного барьера, стимуляцию и регуляцию иммунной системы, метаболизирует и нейтрализует пищевые канцерогены [46, 69, 119, 120, 126, 134]. Микробиота человека также участвует в прямой и косвенной регуляции неврологических функций, влияя на нейрохимические процессы в организме и выработку гормонов [57], синтезирует биологически активные соединения, такие как витамины группы В и витамин К [71]. Таким образом, микробиом человека представляет собой сложную экосистему, функционально интегрированную в физиологию своего хозяина [69]. Состояние микробиоты биотопов в норме, когда ее качественный и количественный состав относительно стабилен и при этом реализуется функция поддержания состояния здоровья организма, называется эубиоз [43, 44]. Однако определить, что такое «нормальная» микробиота, как с точки зрения ее состава, так и ее функций, непросто из-за множества факторов, влияющих на нее, а также из-за значительной меж- и внутрииндивидуальной изменчивости в физиологических условиях [44]. Одним из проявлений эубиоза является синтез короткоцепочечных жирных кислот (SCFAs; ацетат, пропионат и бутират) – наиболее распространенных метаболитов, продуцируемых микробиотой как конечных продуктов ферментации неперевариваемых углеводов в толстой кишке. Эти соединения влияют на физиологию толстой кишки, служат источником энергии для колоноциотов, в итоге попадают в кровоток и влияют на метаболизм и физиологию хозяина [43, 115]. Напротив, термин дисбактериоз или дисбиоз описывает дисбаланс, нарушающий состояние симбиоза. Его характеризуют качественные и/или количественные изменения в составе и функциях микробиоты. При дисбиозе возможно размножение патогенов с сопутствующим снижением количества полезных для здоровья микроорганизмов. Поэтому неудивительно, что микробиота при дисбиотических состояниях часто связана с различными метаболическими и воспалительными заболеваниями, включая ожирение, диабет 2 типа, воспалительные заболевания кишечника, аутоиммунные заболевания, астму, сердечно-сосудистые заболевания, рак [81, 92, 97, 107, 120, 133]. Вместе с тем дисбактериоз может быть следствием, а не причиной заболевания [81]. Одним из основных звеньев патогенеза при нарушении микробиоты является повышение проницаемости кишечной стенки, позволяющей большему количеству липополисахарида поступать в кровоток, что приводит к активации механизмов воспаления [81].

Появление культурально-независимых методов исследования микробиоты, особенно разработки высокопроизводительного секвенирования РНК и ДНК нового поколения (NGS – next generation sequensing) и омикс-технологий (метатранскриптомика, метапротеомика и метаболомика), сделало возможным изучение состава микробиоты и ее функционального и метаболического потенциала [55,115].

Короткоцепочечные жирные кислоты

Одними из основных метаболитов продуцируемых микробиотой кишечника в норме являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК),

состоящие из 2-4 атомов углерода: ацетат, пропионат, и бутират. КЦЖК образуются из пищевых волокон и неперевариваемых углеводов, таких как целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, олигосахариды и лигнин, которые в большей части не расщепляются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта хозяина, перемещаются в толстую и слепую кишку, где подвергаются ферментации микробиотой кишечника, а побочным продуктом этого процесса и являются КЦЖК. Затем КЦЖК попадают в кровоток хозяина при участии натрий зависимого монокарбоксилат транспортера SLC5A8, транспортера органических анионов (mOat2), монокарбоксилат транспортера (MCT1) и путем диффузии. Анализ КЦЖК у мышей с микробиотой показал, что концентрация их в слепой кишке повышена более чем в 100 раз по сравнению со стерильными животными. Бутират практически не обнаруживается в плазме стерильных мышей. Кроме того, было показано, что уровни КЦЖК в сыворотке хозяина (мыши) коррелируют с количеством клетчатки в рационе. Эти данные подтверждают значение микробиоты в образовании КЦЖК. Ацетат продуцируется в большем количестве по сравнению с другими КЦЖК, при этом соотношения ацетат:бутират:пропионат могут быть различными в зависимости от типа питания [107]. К микроорганизмам, продуцирующим бутират, относятся семейства отряда *Clostridiales (Firmicutes): Lachnospiraceae (Coprococcus, Eubacterium, Anaerostipes и Roseburia), Ruminococcaceae (Faecalibacterium и Subdoligranulum) и Erysipelotrichaceae (Holdemanella)*, а также другие представители *Clostridiales: Clostridium, Butyrivibrio, Lachnoclostridium, Marvinbryantia, Oscillibacter, Flavonifractor, Erysipelatoclostridium, Anaerotruncus, Dorea, Blautia и Ruminiclostridium.* Пропионат продуцируется в кишечнике представителями *Bacteroidetes* и некоторыми *Firmicutes*, такими как *Negativicutes (Veillonella, Phascolarctobacterium, Megasphaera), Lachnospiraceae (Coprococcus), Ruminococcaceae,* некоторыми видами *Proteobacteria*, в числе продуцентов также *Verrucomicrobia* и комменсальная бактерия *Akkermansia muciniphila* [96]. Ацетат в основном продуцируется *Bifidobacterium spp.* [130]. Бутират и пропионат преимущественно метаболизируются гепатоцитами и в системном кровотоке появляются в концентрации 1–15 мкМ, а ацетат в диапазоне от 100 до 200 мкМ [65].

После всасывания КЦЖК могут оказывать влияние на клетки двумя способами: взаимодействуя с рецептором, связанным с G-белком (GPCR), и взаимодействуя с гистондеацетилазами. В настоящее время описано 4 рецептора КЦЖК: Gpr41 (FFAR3), Gpr43 (FFAR2), Gpr109a и Olfr78 (OR51E2) (табл. 1). Gpr41 и Gpr43 являются наиболее хорошо изученными. Оба рецептора активируются ацетатом, пропионатом и бутиратом в микромолярном диапазоне.

Таблица 1. Эффекты взаимодействия КЦЖК с рецепторами, ассоциированными с G-белками

Рецептор	Лиганд	Экспрессия	Эффекты
GPR43/ FFAR2 [47,107]	пропионат ацетат бутират	эпителий толстого кишечника, нейтрофилы, эозинофилы, Tregs, адипоциты, скелетные мышцы, сердце, поджелудочная железа, селезенка, эндотелий почечных сосудов	Секреция инсулина, повышение чувствительности адипоцитов к инсулину, секреция GLP-1 and PYY, пролиферация β-клеток, противовоспалительное действие
GPR41/ FFAR3 [96,107]	пропионат бутират	эпителий толстого кишечника, селезенка, красный костный мозг, лимфатические узлы, жировая ткань, портальная вена, периферическая нервная система, поджелудочная железа, мононуклеары периферической крови, эндотелий почечных сосудов	Подавление секреции инсулина, стимуляция продукции GLP-1 и PYY, стимуляция глюконеогенеза в стенке кишечника, стимуляция симпатической нервной системы, противовоспалительное действие
GPR109A/ HCA2 [107,124]	ниацин бутират	апикальная мембрана колоноцитов, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, дендритные клетки, остеокласты, адипоциты, клетки Лангерганса, лимфоциты, эпителий сетчатки, гепатоциты, подоциты, астроциты, клетки микроглии, клетки Шванна	антилиполитическое действие, снижение уровня триглицеридов, созревание Treg в FoxP3, IL-10 продуцирующих T cells, и подавление провоспалительных Th17 клеток
Olfr78/ OR51E2 [96,98]	ацетат пропионат лактат	гладкая мускулатура афферентных сосудов клубочков, энтероэндокринные клетки кишечника, легкие, сердце	стимуляция продукции ренина, повышение АД

При этом пропионат является самым сильным лигандом. Gpr41 взаимодействует с Gαi-субъединицей G-белка, тогда как Gpr43 может связываться как с Gαi, так и с Gαq субъединицами, а также с Gα12 и Gα13. Примечательно, что человеческие и крысиные ортологи Gpr41 реагируют сходным образом на КЦЖК, указывая на то, что передача сигналов через Gpr41 эволюционно консервативна [83, 107, 108]. OR51E1 (Olfr78 у мышей) связан с Gαs и активируется пропионатом и ацетатом. Gpr109a является рецептором КЦЖК, который реагирует на бутират, но не на ацетат или пропионат и, возможно, более известен как рецептор ниацина, связан с Gαi (рис. 1) [83, 96].

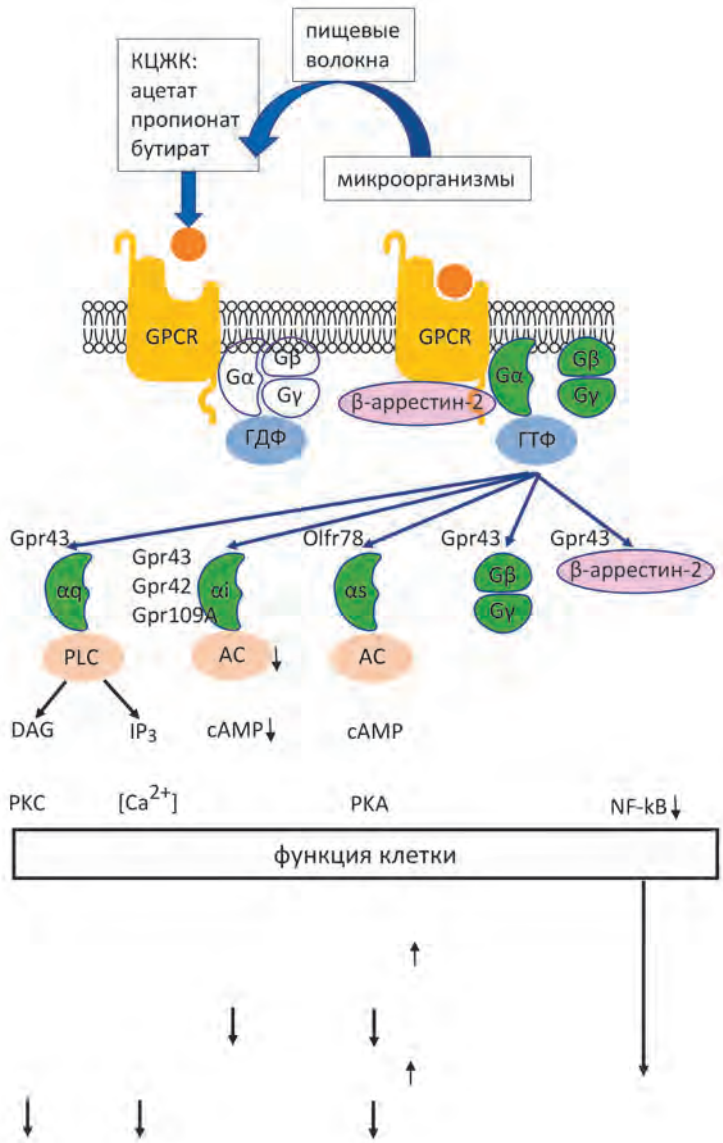

Рисунок 1. Внутриклеточные пути передачи сигнала при взаимодействии короткоцепочечных жирных кислот с рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком; Gα, Gβ, Gγ – субъединицы G-белка, PLC – фосфолипаза C; DAG – диацилглицерол; PKC – протеинкиназа C; IP3 – инозитолтрифосфат; AC – аденилатциклаза; PKA – протеинканаза A; NF-kB – ядерный фактор kB)

Схематично, активация GPR41 пропионатом и бутиратом и активация GPR109a бутиратом приводит к ингибированию накопления циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и активации протеинкиназы

А и митоген-активируемых протеинкиназ (ERK и p38). Стимуляция GPR43 активирует фосфолипазу-Cβ, вследствие чего высвобождается внутриклеточный Ca2+, активирует протеинкиназу C, протеинкиназу A и ERK, ингибирует накопление цАМФ. Рецептор OR51E2 (Olfr78) активирует накопление цАМФ [96,108]. Передача сигнала в клетке возможна при взаимодействии GPR43 и β-аррестина-2 при влиянии пропионата. За счет активации GPR43 и усиления взаимодействия между β-аррестином-2 и I-κBα ингибируется фосфорилирование NF-κB [73, 93]. Белки Gβγ также могут опосредовать собственные сигнальные пути без диссоциации. В итоге все указанные внутриклеточные события отражаются на регуляции активности транскрипционных факторов. Таким образом, КЦЖК оказывают широкое влияние на хозяина: метаболизм, дифференцировку, пролиферацию в основном за счет их воздействия на регуляцию экспрессии генов.

Однако, кроме описанного механизма передачи сигнала КЦЖК в клетку, бутират и пропионат регулируют процессы ацетилирования и деацетилирования в клетке. Гистондеацетилазы (HDAC) и гистонацетилтрансферазы (HAT) модулируют ацетилирование гистонов, которые участвуют в эпигенетической модификации ДНК [89]. Бутират и пропионат проявляют сильное ингибирующее действие на активность гистондеацетилазы (HDAC), при этом бутират более мощный, чем пропионат. Кроме того, бутират метаболизируется в ацетил-КоА, который стимулирует гистонацетилтрансферазу, приводя к дальнейшему усилению ацетилирования гистонов.

Благодаря ингибирующему влиянию на HDAC и стимулирующим свойствам в отношении гистонацетилтрансферазы КЦЖК способствуют посттрансляционной модификации гистонов за счет усиления их ацетилирования. Гиперацетилирование гистонов приводит к увеличению доступности факторов транскрипции к промоторным областям генов-мишеней, тем самым изменяет их экспрессию. Ингибирование HDAC бутиратом не только активирует транскрипцию генов, но и репрессию, например гена индоламин 2,3-диоксигеназы 1 (IDO-1). Было показано, что бутират, кроме ацетилирования гистонов, регулирует процессы ацетилирования и других белков, например фосфатазы 1 митоген активированной протеинкиназы (MKP-1). Ингибирование HDAC снижает деградацию IkBα, таким образом предотвращает активацию и транслокацию в ядро NF-κB [96, 105]. Бутират и пропионат являются неконкурентными ингибиторами HDAC и специфически ингибируют активность HDAC1 и HDAC3. Активность HDAC может быть ингибирована КЦЖК после проникновения в клетку через пассивную диффузию или с помощью натрий зависимых переносчиков монокарбоксилатов (SMCT-1)/Slc5a8 [89].

Регуляция иммунного ответа

Кишечная микробиота играет важную роль в гомеостазе кишечника, контролируя иммунный ответ, в частности за счет продукции КЦЖК. КЦЖК обладают глобальным противовоспалительным эффектом, повышая продукцию противовоспалительных цитокинов и подавляя продукцию провоспалительных цитокинов (рис. 2). КЦЖК оказывают значительное влияние

на иммунные реакции хозяина и барьерные функции, поддерживая благоприятную среду для комменсальных бактерий и ограничивая рост патогенов. КЦЖК усиливают функции эпителиального барьера за счет модуляции секреции противомикробных пептидов эпителием кишечника. Бутират повышает уровень кателицидина LL-37 толстого отдела кишечника in vitro и in vivo. Активация GPR43 с помощью бутирата индуцирует экспрессию β-дефенсинов интестинальными эпителиальными клетками мышей, кроме того, продукция β-дефенсинов в эпителиальных клетках зависит от ингибирования HDAC.

Эксперименты *in vitro* демонстрируют увеличение ацетилирования белков бутиратом, снижают выработку ИЛ-8 в интестинальных эпителиальных клетках (ИЭК). Более того, бутират и, в меньшей степени, пропионат усиливают продукцию TGFβ1 в ИЭК, цитокина, стимулирующего противовоспалительные регуляторные Т-клетки (Treg). Бутират может влиять независимо от GPCR, благодаря ингибирующему действию на HDAC. Ингибирование бутиратом HDAC у макрофагов приводит к повышению продукции антимикробных пептидов: белков семейства S100 – молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением, инициирующих воспаление, фиколина, активирующего систему комплемента, и лизоцима.

Установлено, что обработка бутиратом дендритных клеток (ДК), полученных у доноров, снижает их способность к презентации антигенов и увеличивает продукцию IL-10, что приводит к формированию толерогенного фенотипа [91].

Treg-клетки имеют решающее значение для ограничения воспаления в кишечнике благодаря продукции ИЛ-10, который играет центральную роль в контроле воспалительных процессов. Развитие и функционирование Treg-клеток зависят от сигналов микробиоты, где КЦЖК являются ключевыми метаболитами, стимулирующими дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Treg-клетки в кишечнике. Взаимодействуя непосредственно с наивными Т-клетками, бутират и пропионат усиливают ацетилирование промотора фактора транскрипции Foxp3, необходимого для дифференцировки Treg, что приводит к увеличению экспрессии Foxp3. Пропионат может вызывать такие же изменения через Gpr43. Кроме того, зависимая от бутирата активация Gpr109a увеличивает толерогенный ответ макрофагов толстого кишечника и ДК, способствуя развитию Treg-клеток, продуцирующих ИЛ-10. Механизмы дифференцировки наивных Т-клеток в Treg с помощью агонистов Gpr43 включают продукцию IL-10 дендритными клетками кишечника и макрофагами.

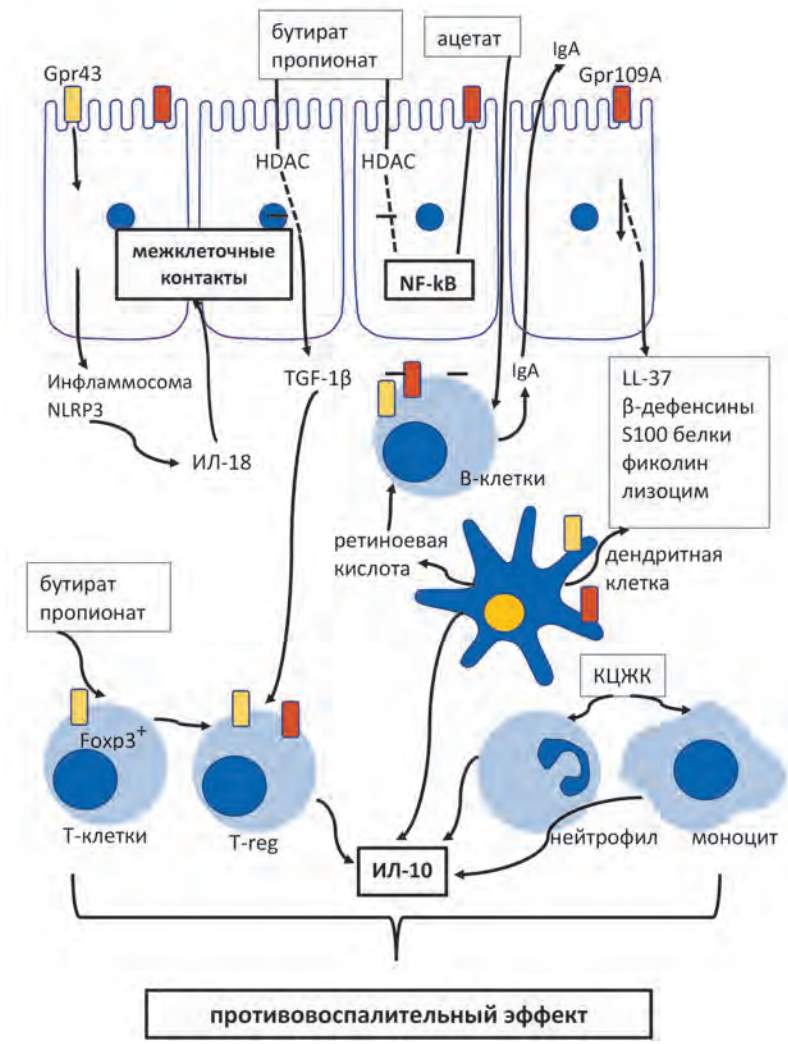

Рисунок 2. Влияние короткоцепочечных жирных кислот на состояние иммунитета в кишечнике

Интересно, что КЦЖК увеличивают продукцию TGFβ1 в ИЭК посредством ингибирования HDAC, тем самым способствуя дифференцировке Treg в кишечнике. В целом исследования показывают, что молекулярные эмеханизмы развития Treg-клеток, индуцированные КЦЖК, многообразны и вовлекают различные типы клеток. Ацетат увеличивает продукцию IgA в кишечнике мышей через Gpr43 зависимый механизм, который заключается в том, что активация Gpr43 ацетатом на дендритных клетках приводит к экспрессии альдегиддегидрогеназы (Aldh1a2), превращающей витамин А в ретиноевую кислоту (РК), которая индуцирует продукцию IgA В-клетками.

КЦЖК повышают синтез антител путем стимулирования дифференцировки В-клеток в плазматические клетки за счет увеличения ацетилирования гистонов и метаболизма В-клеток [48, 49, 96].

Было показано, что стимуляция Gpr43 и Gpr109a короткоцепочечными жирными кислотами в эпителии кишечника активирует образование инфламмосом NLRP3 с последующим образованием IL-18, являющегося критическим регулятором целостности кишечного эпителия, способствующего сохранению межклеточных плотных контактов (TJ-функция), а также обеспечивающего репарацию и выживание клеток в условиях стресса [94, 108, 128].

Стимуляция Gpr109a ингибирует активацию NF-κB в эпителии толстой кишки, что приводит к ингибированию множества генов, экспрессирующих факторы воспаления [121]. Бутират и пропионат подавляют выработку TNFα и активность NF-κB, а также стимулируют продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 в ЛПС-активированных мононуклеарных клетках и нейтрофилах путем ингибирования HDAC [89].

Микробиом и метаболизм хозяина

Кроме синтеза КЦЖК микробиота ответственна за метаболизм пищевых элементов в биологически активные компоненты пищи. Микробиота играет важную роль в метаболических процессах хозяина, обеспечивая синтез витаминов биотина, тиамина, кобаламина, рибофлавина, никотиновой и пантотеновой кислот [64].

В β-клетках островков поджелудочной железы представлены рецепторы КЦЖК Gpr43 и Gpr41. При активации Gpr43 усиливается стимулированная глюкозой секреция инсулина. Активированный Gpr41 снижает секрецию инсулина. Gpr43 также повышает экспрессию факторов, ответственных за пролиферацию β-клеток [109].

Пищевые волокна способствуют снижению веса и улучшают гликемический контроль. Установлено, что пропионат стимулирует глюконеогенез не только в печени, но и в кишечнике, тогда как бутират индуцирует кишечный глюконеогенез. Образовавшаяся под действием пропионата и бутирата в кишечнике глюкоза попадает в кровь и повышает чувствительность тканей к инсулину и толерантность к глюкозе [86].

Ожирение и сахарный диабет 2 типа (СД2) взаимосвязаны и ассоциированы с дисбиотическими изменениями микробиоты кишечника, которые характеризуются значительно сниженным бактериальным разнообразием. Уменьшение относительной численности *Bacteroides spp*. особенно выражено при ожирении, также уменьшается обилие *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Bacteroides*, а количество *Phylum Firmicutes* возрастает [58].

При эубиозе КЦЖК регулируют энергетический баланс и предотвращают прогрессию ожирения, подавляя аппетит и увеличивая расход энергии [50]. Кроме того, укрепление кишечного барьера с участием КЦЖК, а также подавление провоспалительных медиаторов, способствует уменьшению хронического воспаления и предотвращает развитие резистентности к инсулину (ИР), которая наблюдается при СД2. Важно учитывать, что в патофизиологии

СД2 эффекты КЦЖК не ограничиваются их иммуномодулирующими функциями. Они также влияют на секрецию кишечных пептидов, которые участвуют в регуляции аппетита и чувства сытости, таких как глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), YY пептид (PYY) и грелин. В условиях эубиоза пропионат и бутират взаимодействуют с рецепторами FFAR2 и FFAR3, стимулирующими секрецию PYY и GLP-1, соответственно. GLP-1 участвует в регуляции секреции инсулина и глюкагона, эвакуации пищи из желудка. В то же время PYY воздействует на гипоталамус, оказывая анорексигенное действие и способствуя снижению приема пищи у людей [115].

При дисбиозе липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий попадает в системный кровоток и действует как лиганд для TLR-4 клеток иммунной системы и жировой ткани, способствуя высвобождению провоспалительных цитокинов [115, 118]. В качестве одного из путей патогенеза сахарного диабета 1 типа (СД1) рассматривают иммуногенное действие бактериального липополисахарида (ЛПС) [58, 118]. Кроме того, считают, что СД1 возникает в результате аутоиммунного воспаления и разрушения бета-клеток поджелудочной железы, ведущих к недостаточной выработке инсулина. Такое же мнение существует относительно инсулин резистентности (ИР), наблюдаемой при СД2. ИР является результатом активации провоспалительных механизмов, приводящих к снижению эффектов инсулина в периферических органах. По этой причине одним из ведущих механизмов в патогенезе СД является воспаление [115, 118]. Воспалительный процесс, вызванный действием ЛПС кишечных микроорганизмов характеризуется повышением уровней медиаторов и маркеров воспаления, в том числе С-реактивного белка (CPR), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли -α (TNF-α), интерлейкина-17 (ИЛ-17), интерлейкина-23 (ИЛ-23) и трансформирующего фактора роста β (TGF-β). Это приводит к дисфункции бета-клеток поджелудочной железы, ингибирует действие инсулина и индуцирует резистентность к инсулину. Предполагаемый механизм дисфункции бета-клеток поджелудочной железы основан на ингибировании экспрессии инсулина через путь ядерного фактора каппа b (NF-kB), за счет взаимодействия ЛПС с TLR-4 в этих клетках [115].

И наоборот, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) у здоровых людей являются энергетическим субстратом для колоноцитов, регулируют процесс аппетита/насыщения, способствуют противовоспалительному состоянию, активируя рецепторы свободных жирных кислот Gpr43, Gpr41 и Gpr109A. Т. е. в состоянии эубиоза реализация этих механизмов направлена на предотвращение СД [115].

Микробиота, физиология и патология почек

Внимание исследователей к проблеме влияния микробиоты на почки вызвано тем, что микроорганизмы при эубиозе и дисбиозе продуцируют ряд метаболитов, которые ассоциированы с физиологией и патологией почек.

Регуляция артериального давления. В почках были выявлены рецепторы КЦЖК, с которыми связывают функцию регуляции артериального давления (АД). Известно, что Olfr78 экспрессируется в почечной артерии

и крупных ветвях почечной артерии, а также в почечной афферентной артериоле. Установлена экспрессия Gpr41 и Gpr43 в почечной артерии и в других крупных сосудах (аорта, подвздошная артерия). КЦЖК, действуя на Olfr78 и Gpr41, регулируют артериальное давление. Во-первых, SCFAs действуют через Olfr78 в почечной афферентной артериоле, увеличивая высвобождение ренина, тем самым способствуя поддержанию базального уровня ренина и, соответственно, кровяного давления. Во-вторых, КЦЖК действуют на Gpr41, снижая артериальное давление (предположительно за счет вазодилатации). Gpr41 активен при более низких, даже базальных уровнях КЦЖК и, таким образом, возможно, в первую очередь реализует сосудорасширяющий ответ. Однако по мере повышения концентрации КЦЖК в конечном итоге активируется Olfr78, в результате чего АД будет повышаться. Присутствие бактерий, продуцирующих бутират или ацетат и бутират, ассоциируется со снижением АД на модели гипертонии у крыс [107].

Острая почечная недостаточность. Другая область почечной (пато) физиологии, в которой участвуют микробные КЦЖК, – острое повреждение почек. В мышиной модели почечной ишемии-реперфузии (ИР) было обнаружено, что применение ацетата, пропионата или бутирата уменьшало повреждение почек. Любопытно, что аналогичный эффект наблюдался и при лечении мышей с использованием ацетатпродуцирующих бактерий. Это открывает возможность использования КЦЖК и их рецепторов для борьбы с повреждением почек, вызванным ишемией-реперфузией [107].

При ОПН в кишечнике наблюдается дисбиоз, следствием которого является транслокация возбудителя через кишечный барьер в системный кровоток, что способствует развитию воспаления и прогрессированию ОПН.

Хроническая почечная недостаточность. Повреждение почек может быть связано с изменениями микробной популяции кишечника, следствием которых является повышение уровня воспаления, уремических токсинов и артериального давления [95]. При ХПН дисбиоз способствует развитию воспаления. Транслокация эндотоксина (например, липополисахарида; ЛПС) кишечных бактерий приводит к стимуляции клеток иммунной системы и эндотелиальных клеток, секретирующих широкий спектр провоспалительных цитокинов. Установлено, что эндотоксемия коррелирует с риском смертности у пациентов с ХПН и находящихся на гемодиализе [95].

Многочисленные исследования указывают на корреляцию между дисбиозом и ХПН, при этом микробиота толстой кишки способствует прогрессированию ХПН, являясь основным источником уремических токсинов. Уремические токсины р-крезолсульфат (ПКС), индоксилсульфат (ИС) и N-оксид триметиламин (ТМАО) образуются в печени из предшественников, синтезируемых микробиотой: р-крезола, индола и триметиламина (ТМА), соответственно. Сывороточные концентрации ПКС, ИС и ТМАО увеличиваются по мере прогрессирования ХПН. У пациентов с ХПН выявлено увеличение количества микроорганизмов, продуцирующих уремические токсины и снижение обилия микробиоты, которая синтезирует КЦЖК. Следует отметить, что диета с высоким содержанием клетчатки приводит к увеличению синтеза КЦЖК и к снижению уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови [67, 102, 107].

Микробиота и сердечно-сосудистая система

Кишечная микробиота и ее метаболиты влияют на сердечно-сосудистую систему и при дисбиотических состояниях могут являться одним из факторов развития гипертонии и атеросклероза [130]. У больных гипертонической болезнью значительно снижены микробное богатство, обилие и выравненность, а соотношение *Firmicutes*/*Bacteroidetes* заметно увелично. Пробиотические добавки или диета, богатая клетчаткой, уменьшают проявления дисбиоза, восстанавливают продукцию КЦЖК и, таким образом, предотвращают развитие артериальной гипертонии (АГ) [105].

Нарушение целостности кишечного барьера, вызванное дисбиозом кишечника, является значительным фактором риска хронического воспаления и наблюдается при ряде заболеваний, в том числе при гипертонии и атеросклерозе. Бактериальный ЛПС, попадая в кровь, через активацию рецептора TLR4, а затем инициацию NADPH-оксидазы, p38 MAPK и сигнальные каскады NF-κB в эндотелии сосудов приводит к воспалению стенки сосудов и эндотелиальной дисфункции [66]. При дисбиозе может происходить окисление липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), которые ингибируя синтез оксида азота (NO), обладающего сосудорасширяющими свойствами, способствуют развитию гипертонии [59].

В сердечно-сосудистой патологии имеют значение два метаболита триметиламин-N-оксид (TMAO) и индоксил сульфат, образующиеся в печени из предшественников триметиламина и индола, синтезируемых микробиотой кишечника.

TMAO является патогенетическим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний. Существует доказанная корреляция между повышенным уровнем TMAO в крови и тяжелыми исходами инфаркта и инсульта. TMAO поступает в системный кровоток и усугубляет воспалительные реакции в сосудистой стенке, вызванные ЛПС, индуцирует продукцию активных форм кислорода (АФК) и предотвращает обратный транспорт холестерина. TMAO вызывает гиперактивность тромбоцитов, что способствуют развитию атеросклероза и тромбоза [59, 135].

Уровень циркулирующего индоксилсульфата также связан с хроническим воспалением, которое поддерживается повышенной продукцией провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли-α (TNF-α), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и ИЛ-1β. В сердечных фибробластах индоксилсульфат значительно увеличивает синтез коллагена за счет активации p38, p42/44 MAPK и NFκB. Повышенная продукция индоксилсульфата и активация провоспалительных цитокинов положительно связаны с фиброзом миокарда и гипертрофией левого желудочка.

Нарушение эндотелиальной функции является одним из начальных механизмов, приводящих к атеросклерозу. Индоксилсульфат индуцирует эндотелиальную дисфункцию путем ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток за счет повышенной активности NOX4, усиленного образования АФК и снижения экспрессии глутатиона, являющегося антиоксидантном. Продукция АФК, индуцированная индоксилсульфатом, приводит к повышению экспрессии молекул адгезии, включая молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), молекулу сосудистой адгезии-1 (VCAM-1), моноцитарный

хемотаксический белок-1 (MCP-1) и Е-селектин. Экспрессия молекул адгезии играет роль в инициации воспалительных процессов и эндотелиальной дисфункции, которые являются ключевыми событиями в развитии атеросклероза [61].

Ось мозг-кишечник

Связь между мозгом и кишечником происходит внутри комплекса путей взаимодействия, которые в совокупности называются ось мозг-кишечник. Ось мозг-кишечник охватывает ЦНС, кишечную нервную систему, симпатические и парасимпатические ветви вегетативной нервной системы, нейроэндокринную и нейроиммунную системы, включая и микробиоту кишечника. Сложная рефлекторная сеть эфферентных и афферентных сигналов между желудочно-кишечным трактом и ЦНС обеспечивают взаимодействие внутри оси [82]. Понимание того, что симбиоз человека и микроорганизмов играет ключевую роль в поддержании здоровья мозга и, наоборот, в патофизиологии психических заболеваний, предполагает существенное влияние микробиоты на формирование и функционирование оси кишечник-мозг [101].

КЦЖК могут оказывать различное влияние на мозг хозяина. Ацетат проникает через гематоэнцефалический барьер, где активирует гипоталамические нейроны, вызывающие чувство сытости. КЦЖК способствуют созреванию микроглии в головном мозге. Этот эффект зависит от активации Gpr43. Кроме того, КЦЖК регулируют проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Колонизация безмикробных мышей продуцентом бутирата *Clostridium tyrobutyricum* или продуцентом ацетата и пропионата *Bacteroides thetaiotaomicron* снижает проницаемость ГЭБ, повышая экспрессию окклюдина в лобной коре и гипоталамусе. В эксперименте бутират натрия предотвращал разрушение ГЭБ и стимулировал ангиогенез и нейрогенез.

Серотонинергическая передача сигналов имеет решающее значение для функции ЦНС и нервной системы кишечника [82]. Известно, что серотонин синтезируется энтерохромаффинными клетками под действием метаболитов микробного происхождения, таких как КЦЖК (бутират и ацетат) и вторичных желчных кислот (в частности, дезоксиколата), которые индуцируют транскрипцию фермента биосинтеза серотонина триптофан гидроксилазу thp1 [112]. Кроме того, некоторые бактериальные штаммы обладают способностью продуцировать серотонин из триптофана. К ним относятся *Lactococcus lactis cremoris*, *L. lactis lactis, Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli K-12*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* и *Hafnia alvei* [113].

Интерес могут представлять данные об участии микробных сообществ в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, связанных с образованием амилоидных белков [60]. Было установлено, что бактериальные амилоидные структуры могут инициировать образование амилоидных агрегатов при взаимодействии с белками человека [53, 104, 111, 117, 129]. У бактерий амилоидные белки являются компонентами матрикса биопленки, действуют как адгезины, регулируют активность токсинов и факторов вирулентности и составляют внеклеточные

белковые слои [87]. Амилоидные фибриллы обладают высокой устойчивостью и организованностью, а их конформация может передаваться прионоподобным образом на другие белки [87, 123].

Таким образом, влияние микробиоты на организм внутри оси мозг-кишечник реализуется благодаря продукции метаболитов и регуляции функционального состояния клеток человека, оказывая существенное влияние на поддержание состояния здоровья и развитие патологии.

Микробиом и канцерогенез

Дисбактериоз кишечника является одной из причин воспаления и связан с развитием колоректального рака. Около 15% всех случаев рака являются следствием вирусной или бактериальной инфекции. Микробные патогены могут влиять на онкогенез, участвуя в синтезе активных форм кислорода, непосредственно повреждающих ДНК, и косвенно путем создания провоспалительной микросреды.

Например, заражение *Helicobacter pylori* приводит к хроническому воспалению с участием β-катенина в корегуляции экспрессии онкогенов Jun, c-Myc и CyclinD-1 в эпителиальных клетках, способствующих развитию злокачественных новообразований. Также при инфицировании *H. pylori* увеличивается риск развития аденокарциномы в толстой кишке. Энтеротоксигенные *Bacteroides fragilis* стимулируют пролиферацию клеток за счет повышения уровня транскрипции ДНК с участием β-катенина и способствуют формированию активных форм кислорода, повреждающих ДНК.

Колоректальный рак связан с повышенным обилием в кишечной микробиоте бактерий *Firmicutes* и *Fusobacteria*. *Fusobacterium nucleatum,* являясь распространенным видом в опухолевых тканях, экспрессирует фактор вирулентности Fusobacterium adhesin A (FadA). Данный фактор адгезии повышает проницаемость эпителия и инвазию микроорганизмов в клетки. FadA также активирует пролиферацию и рост нормальных клеток и клеток аденомы, участвуя в реализации сигнальных путей β-катенина.

Дисбиотически измененный микробиом может запускать развитие опухоли посредством реакций врожденного иммунитета. При дисбиозе происходит повышенная и хроничесая стимуляция толл-подобного рецептора TLR4 бактериальным липополисахаридом (ЛПС), что способствует образованию и росту колоректальных опухолей. Наличие воспаления у лиц с ожирением коррелирует с более высоким риском колоректального рака. Активация TLR4 также наблюдается при воспалительных заболеваниях кишечника, при этом язвенный колит и болезнь Крона являются факторами риска колоректального рака [132].

Для хронического воспаления, вызванного микробиотой кишечника, характерен окислительный стресс. При стимуляции хронического воспаления повышается продукция активных форм кислорода и азота, которые могут вызвать повреждение ДНК, в дальнейшем активировать онкогены или инактивировать гены-супрессоры опухолей [52]. Известно, что токсин *Bacteroides fragilis* через активацию NF-κB фактора в кишечном эпителии может увеличивать продукцию оксида азота, который приводит к повреждающему действию на клеточную ДНК [51].

КЦЖК оказывают антионкогенное действие благодаря их противовоспалительному эффекту, реализуемому через рецепторы, сопряженные с G-белками, и способности ингибировать гистондеацетилазу (HDAC). После связывания бутирата с HDAC происходит гиперацетилирование гистонов и изменение экспрессии генов, это приводит к блокированию клеточного цикла и активации апоптоза в опухолевых клетках, в результате подавляется опухолевый рост [99].

Микробиом как фактор колонизационной резистентности организма в искусственной среде обитания и пути оптимизации его состава

Искусственно измененная среда обитания создается человеком тогда, когда он познает природу вещей, лежащих вне рамок повседневных условий существования. Это в первую очередь касается освоения космоса, в том числе планет Солнечной системы. Для решения этих задач создаются искусственные антропоэкосистемы с измененными параметрами среды обитания. В таких измененных условиях филогенетически сложившееся взаимоотношение коактантов экологической системы «человек – микроорганизмы» претерпевает изменения. Оно принимает форму синдрома нарушения колонизационной резистентности.

Наше столетие ознаменовалось освоением человеком регионов Земли и околоземного пространства, что обусловлено интенсивным взаимодействием законов биосферы с деятельностью человеческого разума. Освоение космического пространства требует личного участия человека, деятельность которого осуществляется в условиях все возрастающих чрезвычайных эмоциональных и физических нагрузок.

Микробная безопасность космических полетов представляет собой один из важнейших аспектов медицинского обеспечения этих мероприятий. На протяжении многих лет рядом исследователей была продемонстрирована активизация условно-патогенной микрофлоры человека в процессе пребывания его в герметично замкнутых объектах различных назначений. При этом возбудителями инфекционных заболеваний в условиях космического корабля могут оказаться представители микрофлоры членов экипажа. Отличительными особенностями этих микроорганизмов является их способность вызывать инфекционные заболевания при наличии определенных условий, основными из которых являются снижение иммунологической реактивности и своеобразие микробиологической обстановки, формирующейся в герметично замкнутом помещении. Основными этиологическими агентами инфекционных заболеваний в этих случаях являются представители аутомикрофлоры человека, а также возможно перекрестное инфицирование, когда возбудитель передается от носителей к восприимчивому организму. В качестве источника инфекции можно рассмотреть два ее вида – антропогенные и неантропогенные источники. В числе первых главнейшую роль играет носительство операторами герметично замкнутых помещений (ГЗП) облигатно- и условно-патогенных микроорганизмов. Так, было показано [12], что у космонавтов, совершивших 8-суточные полеты, количество условно-патогенных микроорганизмов возрастало в сотни и тысячи раз,

увеличивалось и число энтеробактерий, способных к образованию ферментов патогенности. Было установлено, что в процессе пребывания людей в гермообъектах происходит замена авирулентных штаммов Clostridium perfringens на вирулентные. Та же тенденция прослеживалась для штаммов Staphylococcus aureus [9, 11].

Первые исследования состава микрофлоры человека до и после космического полета были проведены Алексеевой (1965). Полученные ею экспериментальные данные свидетельствовали о наличии определенных сдвигов в составе микрофлоры полостей рта и зева, а также кожных покровов экипажей космических кораблей «Восток». Возможность развития неблагоприятных изменений в составе аутомикрофлоры экипажей космических кораблей была подтверждена при осуществлении многочисленных модельных исследований с участием обследуемых в герметично замкнутых помещениях. Большой интерес представляли данные, полученные при осуществлении в 1970 году 18-суточного полета космического корабля «Союз-9». Как показали результаты исследований, наиболее выраженные изменения после окончания полетов были выявлены в составе микрофлоры полости носа и кожных покровов космонавтов. В обзоре, посвященном обобщению результатов космического полета кораблей серии «Аполлон» сообщалось о сдвигах в составе микрофлоры кожи членов экипажа, проявляющихся в превалировании грамположительных кокков (стафилококков и стрептококков), некотором угнетении анаэробных представителей микрофлоры, временной колонизацией верхних дыхательных путей чужеродными микроорганизмами, главным образом стафилококками, что могло явиться результатом микробного взаимообмена [116]. Суммируя литературные данные, можно определить перечень микроорганизмов, представляющих собой вероятных возбудителей инфекционных заболеваний дыхательного тракта и кожных покровов у космонавтов. В первую очередь к ним относятся патогенные стафилококки, стрептококки и представители семейства Enterobacteriaceae, а также клостридии, синегнойная палочка и грибы [40, 77].

В течение времени пребывания в космической орбитальной станции у космонавтов существенно меняется состав нормальной микрофлоры, в результате чего угнетается резистентность организма человека к проникновению в него инфекционных агентов. В годовом медико-техническом эксперименте у обследуемых в кишечнике были зарегистрированы резкое уменьшение, вплоть до полного исчезновения, количества бифидобактерий и лактобацилл, снижение ферментативной и антагонистической активности у штаммов кишечной палочки, обмен штаммами кишечной палочки, увеличение токсигенности ряда организмов. Результаты микробиологических исследований в имитационных экспериментах были подтверждены в условиях реальных космических полетов. Так, при обследовании членов экипажей «Аполлон» и «Скайлэб» отмечалось снижение числа анаэробных и возрастание аэробных микроорганизмов различных видов. В отношении стафилококковой флоры они выражались в возрастании массивности ранее имевшихся очагов патогенных стафилококков или образовании новых очагов в результате колонизации экзогенными культурами, источниками которых служили другие члены экипажей или экспедиций посещения.

При этом в ряде случаев из гетерогенных популяций золотистого стафилококка, вегетирующих в открытых биотопах космонавтов, происходил отбор штаммов определенного биотипа, которых отличала способность к «эпидемическому» распространению в изолированном коллективе, что проявлялось в формировании промежуточного носительства у новых хозяев. Учитывая, что участвующие в нем штаммы Staphylococcus aureus продуцировали токсины и, следовательно, вызывали определенную иммунологическую перестройку организма реципиента, он может быть квалифицирован как безманифестная форма стафилококковой инфекции. Рост токсинообразования у стафилококков был отмечен и в длительных экспериментах с изоляцией [17].

Появление же клинических симптомов, как это имело место в отдельных случаях, могло быть спровоцировано дополнительным воздействием на организм какого-либо неспецифического травмирующего или астенизирующего фактора. Особую роль сыграла стабильность бактериальных аэрозолей в условиях микрогравитации, наиболее ярко продемонстрированная в условиях полета станции «Салют-7», в котором штаммы золотистого стафилококка из состава микрофлоры экипажа, покинувшего станцию, сохранялись в составе микрофлоры среды станции и впоследствии контаминировавшие верхние дыхательные пути космонавтов из состава экипажа, прибывшего на станцию около полугода спустя [12].

Их распространение может проходить как в результате прямого контакта с носителем, так и опосредованно, при участии элементов среды обитания. В последнем случае из основных биотопов передних отделов полости носа, полости рта и зева, пищеварительного тракта микроорганизмы могут попадать на различные участки кожных покровов носителя, постоянно выделяться при кашле, при дыхании, артикуляции в газовую среду, поступать в ассенизационное устройство. В результате непосредственного контакта, а также процессов аэрогенной контаминации указанные микроорганизмы обсеменяют конструкционные материалы интерьера и используемых систем жизнеобеспечения. Здесь возможно формирование при наличии благоприятных условий (локальное повышение температуры, влажности, скопление конденсата атмосферной влаги, продуктов жизнедеятельности человека) специфических резервуаров накопления и размножения микрофлоры [77].

Существенные сдвиги в количественном и видовом составе микробиоты происходят уже в предполетный период. Это увеличение почти вдвое доли, сформированной условно-патогенными видами микроорганизмов на покровных тканях и слизистых оболочках; увеличение (также почти вдвое) доли, сформированной микроорганизмами условно-патогенных видов в больших количествах. Это приводит к тому, что микробные очаги, сформированные в слизистой оболочке верхних дыхательных путей настолько велики, что микроорганизмы в их составе начинают выделяться в среду при обычном разговоре. Изменение микрофлоры кишечника происходит таким образом, что в предполетный период больше не встречается нормобиоз, превалирует дисбактериоз второй (рост условно-патогенной микрофлоры) и третьей (рост условно-патогенной микрофлоры, декомпенсированной за счет снижения количества протективной микрофлоры) степеней [16] (табл. 2-4).

Эти предполетные изменения продиктованы следующими обстоятельствами:

– «стресс ожидания» перед полетом;

– результат транслокации в другие географические регионы, где находятся космодромы.

Таблица 2. Количество видов условно-патогенных микроорганизмов в исследованных биотопах космонавтов (% к общему количеству определенных видов)

Биотопы	Перед полетом		После полета	
	60 день	7-5 день	0-5 день	14 день
Зев	29.4	30.0	18.1	28.6
Нос	25.0	41.1	23.0	20.0
Подмышечная впадина	10.0	38.4	27.2	40.0
Лопатка	33.3	33.3	38.4	11.1
Ладонь	28.5	31.2	33.3	25.0
Ухо	33.3	33.3	30.0	18.1
Все биотопы	27.5	43.0	28.8	26.6

Таблица 3. Общая характеристика микробной контаминации покровных тканей и слизистых оболочек верхних дыхательных путей космонавтов (% «положительных проб»)

Позиции	Перед полетом		После полета	
	60 день	7-5 день	0-5 день	14 день
Отношение общего числа изолированных видов к числу изолированных патогенных видов	27	48.5	35.4	27.9
Отношение количества изолированных патогенных видов, формирующих значительные микробные очаги, к общему числу изолированных видов	14,4	23.7	19.7	9.3

Таблица 4. Дисбактериоз кишечника космонавтов (% случаев)

Сроки обследования	Степень дисбактериоза			
	норма	1	2	3
60 суток до полета	6,7	73,3	13,3	67
0 сутки до полета	6,3	31,3	31,3	31,3
0 сутки после полета	0	36,8	36,8	26,3
14 сутки после полета	26,7	20.0	26.7	26.7

Основными изменениями микрофлоры человека в условиях космического полета на орбитальных станциях являются следующие.

В течение первых 7-12 дней изоляции происходит интенсивный плазмидный и микробный обмен между членами экипажа. В этот период велик, как никогда, риск аутоинфекций и перекрестных инфекций у членов экипажа. В этот период происходит распространение условно-патогенных микроорганизмов в несвойственные биотопы, увеличение массивности микробных

очагов, сформированных в традиционных нишах обитания, количественная редукция микроорганизмов протективных видов, замена более вирулентными штаммами менее вирулентных в пределах одного вида на примере клостридий (табл. 5, 6). Аналогично изменяется кокковая флора кожи на фоне существенного ослабления ее колонизационной резистентности.

Эксперименты с изоляцией являются надежным инструментом для исследований динамики изменений микробиоценоза. С их помощью можно установить, в частности, факт замены менее вирулентных штаммов золотистого стафилококка более вирулентными, динамику изменений колонизационной резистентности покровных тканей, которая существенно снижается во время эксперимента (таблица 7) [7, 8, 14, 15, 17, 20].

Таблица 5. Рост патогенности золотистого стафилококка у обследуемых в экспериментах длительностью до 30 суток

Низкий титр (1:40 – 1:80)		Высокий титр 1:160 и более	
До эксперимента	После эксперимента	До эксперимента	После эксперимента
35	24	20	42
Всего исследован 121 штамм			

Таблица 6. Динамика вирулентности золотистого стафилококка в гермокамерном годовом эксперименте

Срок высеваемости штаммов	% летальности зараженных мышей
До эксперимента	7-10
1-2 месяц эксперимента	7-10
4-7 месяц эксперимента	30-40
8-12 месяц эксперимента	60-70
Окончание эксперимента	60-70

Таблица 7. Изменение колонизационной резистентности кожи у обследуемых в экспериментах с изоляцией длительностью до 30 суток

Обследуемые, время экспозиции	Индекс бактерицидности (% погибших кишечных палочек)					
	Сроки исследования					
	До эксперимента	Сутки эксперимента				После эксперимента
		3	11	18	26	
А, 3 мин.	90	15	88	92	85	54
А, 10 мин.	100	99	96	96	95	93
Б, 3 мин.	94	74	97	81	84	67
Б, 10 мин.	100	98	99	98	94	88
В, 3 мин.	97	8	94	34	68	34
В, 10 мин.	100	75	98	74	98	84

Наряду со слизистыми оболочками верхних дыхательных путей, существуют неблагоприятные изменения микрофлоры и местного иммунитета пародонта. Это касается в первую очередь экологической экспансии пародонтопатогенных бактерий на фоне количественной редукции протективной микрофлоры [5, 18, 28, 35]. Это подтверждается и результатами наземных экспериментов: «Антиортостатическая гипокинезия», «Сухая иммерсия» [19, 36]. В экспериментах с сухой иммерсией показан рост патогенных бактерий и угнетение протективных групп микроорганизмов в ЛОР-органах [32, 33, 34].

Итак, позволительно предположить три фактора, определяющих успех или неуспех долговременной изоляции с позиций микробиологической безопасности человека:

– преодоление самого неблагоприятного рубежа – первых 7-15 суток изоляции;

– состав микробиоты, вносимой группами посещения или в составе грузопотока;

– наличие условий для формирования «госпитальных штаммов» в условиях изоляции.

В длительных космических полетах, не сопровождающихся посещениями экипажей и их сменами, например полетах на орбитальных станциях типа «Салют» и таких, какие предполагаются для реализации марсианской и лунной программ, после периода острой адаптации в составе микрофлоры членов экипажа происходит снижение количества условно-патогенных видов, а в их популяции снижается доля, сформированная их представителями, обладающими выраженной способностью продуцировать ферменты агрессии и защиты [74, 79].

На станциях «МКС» и «Мир» этот процесс занимает, по сути дела, весь период времени до возвращения экипажа либо до очередной микроэкологической пертурбации, вызванной появлением нового микробного консорциума в составе микрофлоры новоприбывших членов экипажа либо в составе грузопотока. Между новоприбывшими и основными членами экипажей происходит активное и быстрое распространение не только штаммов условно-патогенных микроорганизмов, колонизующих верхние дыхательные пути, но и представителей кишечной микрофлоры. Они очень легко передаются от участников группы посещения к членам основной группы, и часть из них способна находиться там вплоть до окончания полета. В этот процесс вовлекаются и последующие члены групп посещения, и полезный груз, привносящие новые и новые микробные консорциумы в пилотируемый космический корабль (ПКК).

Поэтому, учитывая весьма высокую реципиентную способность экипажей, можно предположить достаточно пагубный сценарий для марсианских и лунных экспедиций при высадке на планеты, в которых присутствует микробный консорциум, способный интегрироваться в микробиоценоз членов экипажа, либо при возвращении на Землю.

В условиях межпланетного полета проблема привнесения в ПКК новых микробных консорциумов в составе групп посещения и полезного груза не стоит. Зато очень актуальна проблема привнесения в среду обитания ПКК микроорганизмов в процессе контаминации скафандров в процессе

внекорабельной деятельности. Уже на этапе орбитальных полетов исследователи подтвердили наличие спорообразующих микроорганизмов земного происхождения на внешней поверхности МКС. Эти микроорганизмы впоследствии использовались для исследований выживаемости при прохождении плотных слоев атмосферы в составе имитатора метеорита. Исследования показали высокую выживаемость в таких экстремальных условиях при разогреве материала до 600-1000°С [122]. Эти микроорганизмы могут быть объектами эпидемиологической настороженности. Разумеется, условия их существования в условиях скудной среды и в условиях инкапсуляции не ставят эти микроорганизмы в ряд особо опасных для человека, однако классические примеры развития инфекций по сапронозному типу не исключают такого развития событий при межпланетном полете, когда микроорганизмы существуют в двух фазах – «дремлющей», сапрофитической, и «агрессивной», патогенной. В этом случае микроорганизмы «атакуют» непосредственно из ниш обитания, минуя традиционную «триаду Громашевского» – источник инфекции, пути передачи и восприимчивый организм. Таким образом, возникает, например, синегнойная инфекция у водолазов-глубоководников. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что во всех биотопах водолазов-глубоководников с началом периода изопрессии происходит постепенное снижение уровня содержания комменсальной микрофлоры, сопровождающееся нарастанием количества условно-патогенных грамотрицательных бактерий. Так, в открытых биотопах (наружные слуховые проходы, верхние дыхательные пути, кожные покровы) содержание основных представителей комменсальной микрофлоры –грамположительных микроорганизмов (коринебактерии, стафилококки, микрококки, стрептококки) – последовательно снижалось вплоть до полной элиминации. При этом указанные биотопы становились объектом колонизации для условно-патогенных грамотрицательных бактерий, среди которых доминировали синегнойные палочки. Указанные изменения носили линейно-прогрессирующий характер и достигали максимума в последние сутки изопрессии [6, 106].

В период гипербарической изопрессии в условиях длительных погружений колонизация синегнойной палочкой открытых биотопов происходила экзогенным путем, при этом источником инфекции служили антропо-технологические ниши, освоенные возбудителем в качестве резервуара накопления и репродукции – в первую очередь система водообеспечения и другие влагосодержащие элементы оснащения и оборудования барокамеры. В большом числе случаев процесс колонизации синегнойной палочкой наружных слуховых проходов водолазов сопровождался развитием манифестных форм инфекции в виде наружных отитов. С началом декомпрессии, а также в период реабилитации, наблюдалась тенденция к восстановлению комменсальной флоры и вытеснению из биотопов условно-патогенных грамотрицательных бактерий.

Было отмечено, что контаминация синегнойной палочкой верхних дыхательных путей водолазов была связана с использованием для мытья воды из системы водообеспечения барокомплекса. Штаммы синегнойной палочки, изолированные от водолазов и из системы водообеспечения барокомплекса, были идентичны. В некоторых случаях вместо синегнойной палочки в системе водообеспечения ГВК нами были обнаружены дрожжи Candida

albicans. На этих плавсредствах специалистами описывались случаи кандидозных отитов [3, 75].

В процесс патогенизации микрофлоры вовлекаются практически все биотопы. Так, в кишечнике также отмечается процесс редукции грамположительных микроорганизмов защитных групп, вытесняемых грамотрицательными потенциальными патогенами [131].

Как известно, главным способом лечения инфекций является использование антибиотиков. Однако результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что в условиях гипербарии устойчивость микроорганизмов к антибиотикам может существенно изменяться. Так, при исследовании штаммов синегнойной палочки, выделенных в одном из ГВК в течение двух последовательно проводимых в нем экспериментов, отмечено нарастание их антибиотикоустойчивости. Примечательно, что, наряду с возрастанием устойчивости к препаратам широкого спектра действия, у исследуемых штаммов формировалась устойчивость и к препаратам выбора для лечения синегнойной инфекции – тобрамицину, азлоциллину, амикацину [23].

Приобретение признаков множественной лекарственной устойчивости микроорганизмами в условиях гипербарии могло быть связано с особенностями передачи R-плазмид в этих условиях. Результаты исследований, проведенных in vitro, показали, что при повышении давления до 1,0 МПа (воздух), частота переноса всех без исключения маркеров антибиотикорезистентности в составе исследованных плазмид имела тенденцию к увеличению. При этом характеристики частоты переноса плазмид в условиях гипербарии и при нормальном давлении отличались весьма существенно (1000 и более раз). При этом доноры плазмид, инкубированные в условиях гипербарии, сохраняли повышенную коньюгативность даже после длительного пассирования в условиях нормального давления [80]. Это же отмечается и для нормобарических гипоксических сред, где азотная составляющая частично заменена на аргон для создания пожаробезопасной среды в гермопомещениях [1, 22].

Подобно описанным для гипербарических объектов сюжетам развивается риск развития инфекций микроорганизмами-технофилами в длительном космическом полете и криптическими микроорганизмами из состава микробиоценозов внешней оболочки станции. Классическим примером того, как быстро штаммы сапрофитических микроорганизмов, случайно занесенных в среду обитания ПКК, меняют свои трофологические преференции, служит «хрестоматийная» ситуация с освоением в качестве источников питания неметаллических поверхностей, бортовой кабельной сети и других объектов инфраструктуры ПКК рядом почвенных сапрофитов, силою случайных обстоятельств занесенных в среду обитания ПКК. Для этого было достаточно срока гораздо меньшего, чем десятилетие. Позволительно предположить аналогичное развитие ситуации применительно к экстратеррестриальным микроорганизмам, попавшим в среду ПКК и лунных баз. При этом в качестве «жертв» следует рассматривать одновременно человека и объекты среды обитания [76].

Известны, кроме этого, исследования C.Vicramasinghue с коллегами [103], изучавших состав микрофлоры пылевых частиц, образованных

в стратосфере, которые свидетельствуют о том, что примерно десятая часть изолятов не типировалась существующей на Земле библиотекой генов. Это может предположить не только «восходящий», но и «нисходящий» путь транслокации микроорганизмов в составе пылевых частиц в земной атмосфере. И чем выше траектория полета, тем выше вероятность вовлечения таких микроорганизмов в среду обитания ПКК, что делает прогноз микробиологической безопасности экипажа малопредсказуемым [56].

Поэтому в обозримый период следует широко и тщательно изучать биологическую или биогенную контаминацию пыли на траектории полетов космических аппаратов, находящихся в доступности или проектируемых в обозримые сроки – МКС, РОС, «Бион-М» №2, «Бион-М» №3, «Возврат-МК». Это совершенно необходимо для прогнозирования экзобиологического фактора в качестве возможного инфекционного риска.

Еще одним микробиологическим риском межпланетных полетов и лунных баз является влияние факторов комплексного воздействия среды лунного грунта на микробиоту человека. Эксплуатация лунных баз предусмотрит, как минимум, несколько сменяемых экипажей, и, как следствие, возможен временной перерыв между экспедициями. При возможности контаминации лунного грунта террестриальной микрофлорой возможна ее трансформация под действием ионизирующей и неионизирующей радиации и, возможно, иными мутагенными факторами. В результате этого микрофлора, филогенетически оставаясь тропной человеческому организму, может приобрести малопрогнозируемые свойства.

Это обстоятельство определяет необходимость проведения следующих исследований:

– разработка системы мер по предупреждению контаминации лунного грунта антропогенной микрофлорой;

– проведение исследований влияния воздействия комплекса факторов среды лунной поверхности на свойства микроорганизмов – представителей микрофлоры человека.

Особое внимание должно уделяться принципам антибактериальной терапии космонавтов в случае возникновения у них инфекционных заболеваний, вопросам устойчивости бактериальных культур к антибиотикам. Вероятной причиной изменения лекарственной чувствительности у космонавтов исследователи считали распространение R-плазмид, тем более что признаки лекарственной устойчивости легко передавались штамму реципиенту в лабораторных условиях.

Чувствительность к антибиотикам в условиях космического полета изменяется несущественно. Многочисленные исследования, проведенные ин витро в результате экспозиции культур микроорганизмов (золотистого стафилококка и кишечной палочки) в условиях космического полета биоспутников серии «Бион» свидетельствуют о лишь незначительном увеличении чувствительности к бета-лактамным препаратам и аминогликозидам. Однако этого незначительного изменения было вполне достаточно для того, чтобы перевести исследуемые культуры из разряда чувствительных в разряд умеренно чувствительных, а умеренно чувствительные в разряд устойчивых, что очень важно для прогнозирования успешности антибиотикотерапии в случае ее показания.

Что касается частоты распространения генетических факторов, определяющих устойчивость к антибиотикам, изменения частоты переноса в сторону увеличения (в 10 раз), оно касалось грамположительных палочек. Эти особенности не затрагивали грамотрицательную флору. Вместе с тем сегрегационная стабильность плазмидных коинтегратов, сформированных в результате исследований ин витро в космическом полете, гораздо выше в условиях космического полета [54]. То есть геномные коинтеграты, детерминирующие множественную лекарственную устойчивость, сформировавшиеся в условиях космического эксперимента на МКС, очень прочны и не сегрегируются или элиминируют с течением времени (табл. 8 – 11). Это обстоятельство также является фактором риска, поскольку есть основания предполагать достаточно интенсивное формирование штаммов с признаками госпитализма в условиях длительного космического полета. Поэтому необходимо проводить углубленные исследования чувствительности к антибиотикам и обмена генами лекарственной устойчивости у микроорганизмов, подверженных воздействиям факторов межпланетного полета и лунного грунта. На основании полученных результатов можно рассчитать риск формирования штаммов с признаками госпитализма в условиях межпланетных полетов и на лунных базах [78].

Таблица 8. Частота передачи плазмид антибиотикорезистентности в космическом полете

Грамположительные культуры	Эксперимент	Контроль
Конъюгация в условиях космического полета	$2{,}5\times10^{-2}$	$2{,}0\times10^{-1}$
Конъюгация на Земле, культуры преинкубировались в космосе	$1{,}5\times10^{-2}$	$1{,}3\times10^{-1}$
Мобилизация в условиях космического полета	$3{,}1\times10^{-4}$	$1{,}6\times10^{-1}$
Мобилизация на Земле, культуры преинкубировались в космосе	$1{,}9\times10^{-5}$	$1{,}5\times10^{-5}$

Таблица 9. Частота передачи плазмид антибиотикорезистентности в космическом полете

Грамотрицательные культуры	Эксперимент	Контроль
Конъюгация в условиях космического полета	$3{,}0\times10^{-2}$	$6{,}5\times10^{-3}$
Конъюгация на Земле, культуры преинкубировались в космосе	$8{,}0\times10^{-3}$	$9{,}4\times10^{-3}$
Мобилизация в условиях космического полета	$2{,}6\times10^{-2}$	$4{,}2\times10^{-2}$
Мобилизация на Земле, культуры преинкубировались в космосе	$1{,}6\times10^{-3}$	$4{,}1\times10^{-4}$

Таблица 10. Среднее количество детерминант на штамм в трансконъюгатах

Условия	Эксперимент	Контроль
Грамположительные культуры, преинкубированные в космосе, конъюгация на Земле	3,3	1,5
Грамотрицательные культуры, преинкубированные в космосе, конъюгация на Земле	1,6	1,7
Грамположительные культуры, мобилизация в условиях космического полета	3,2	2,7
Грамотрицательные культуры, мобилизация в условиях космического полета	2,0	1,5
Среднее значение	2,5	1,8

Таблица 11. Изменение множественной лекарственной устойчивости в процессе изоляции групп из 4 человек в гермообъекте в течение 30 суток (% от общего количества изолированных культур)

Число детерминант резистентности	Сутки эксперимента			
	0	7-10	20-22	30-32
0	40,5	52,0	24,3	43,7
1	20,0	18,7	40,1	14,2
2	18,7	19,4	17,0	19,7
3	6,8	14,0	12,2	19,7
4	4,3	7,0	3,2	5,7
5	1,7	3,0	2,1	2,3
6	2,4	1,4	0,5	0,5
7 и более	0,4	3,0	0,3	5,4

Таковы проявления синдрома нарушения колонизационной резистентности организма в искусственной среде обитания, а также микробные инфекционные риски, существующие в текущей практике пилотируемой космонавтики и прогнозируемые для космических межпланетных полетов и лунных баз. Для того чтобы продвинуться в понимании остроты и важности прогнозов, необходимо провести серию исследований, о чем говорилось выше. И все же общим выводом по микробиологическому клиническому разделу является необходимость выработки эффективных профилактических мер, способных укрепить колонизационную резистентность членов экипажа навстречу этим прогнозируемым вызовам.

На сегодня существует арсенал пробиотических средств, способных укрепить колонизационную резистентность, в том числе пробиотиков, основанных на штаммах лактобацилл, изолированных от космонавтов. Последнее обстоятельство позволило провести целую серию исследований эффективности пробиотиков, основанных на использовании аутологичных штаммов микроорганизмов – представителей протективных групп микроорганизмов. Исследования позволили прийти к заключению о возможности использования в качестве аутопробиотиков культуры бифидобактерий, лактобацилл,

энтерококков, коринебактерий, саливарных стрептококков как сочетано, так и порознь, в зависимости от биотопа, требующего санации [10, 29, 85].

Для оптимизации микрофлоры кишечника следует использовать аутопробиотики, основанные на бифидобактериях, лактобациллах и энтерококках. Примером положительного результата от использования аутопробиотиков на основе энтерококков служат данные эксперимента Марс-500, в котором прием аутопробиотиков в первой половине эксперимента привел к эрадикации условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике [24], а также в экспериментах «Сухая иммерсия» [41]. Для сравнения, в конце эксперимента использовались препараты-пробиотики, основанные не на аутологичных, а коллекционных, коммерческих штаммах. Позволительно заключить, что аутопробиотики следует принимать, преследуя цель добиться эрадикации нежелательной бактериальной группы, в то время как, используя коммерческие препараты, можно лишь стабилизировать микрофлору на каком-либо приемлемом уровне. Для сценариев межпланетных полетов и лунных баз приемлемыми представляются оба варианта [2]. Имеется положительный опыт использования аутопробиотиков в сочетании с продуктами питания – кисломолочными и напитками брожения [13, 25], а также пребиотиков [37, 38]. Обоснована разработка средств и методов аутопробиотикотерапии для зубочелюстной системы [26].

Предварительные результаты применения аутопробиотиков в экспериментах, имитирующих измененные условия обитания, а также в клинических исследованиях говорят об их несомненной эффективности. Отсутствие проблем развития инфекционных осложнений, биологической несовместимости и приживляемости позволяет предположить эффективность применения аутопробиотиков в лечении новорожденных, пожилых людей и иммуносупрессированных пациентов. В настоящее время концепция создания криобанков микробиоценозов человека и аутопробиотиков может рассматриваться как отдельная часть персонализированной медицины. Применение индивидуализированного подхода в выборе препаратов позволит повысить эффективность профилактики и лечения, а также понизить риск развития неблагоприятных эффектов у каждого отдельного человека.

Форма выпуска препарата варьирует для разных условий полета и пребывания на лунных базах. Это таблетки, периодонтальные повязки, порошки, свечи, восстановленное молоко. Перечень видов микроорганизмов, входящих в перспективный перечень аутопробиотиков, открыт. Стоит рассмотреть возможность включения кишечной палочки и ряда других микроорганизмов, в том числе условно-патогенных для того, чтобы разнообразить вносимый в биотопы микробиоценоз различными его коактантами [4, 30, 31, 42]. Непонятно пока что, какие микроорганизмы можно применять для оптимизации микрофлоры кожи, стоит ли вообще это делать.

Для того, чтобы получить ответы на эти вопросы, необходимо проведение серии исследований, посвященных следующим вопросам:

– исследования сроков хранения аутопробиотических препаратов в лиофилизированном виде и в условиях криохранилищ;

– исследование стабильности препаратов в условиях воздействия радиации в параметрах, характерных для лунного грунта;

– исследование эффективности новых аутопробиотиков и новых форм их выпуска в экспериментах, имитирующих факторы космического полета (гипокинезия, сухая иммерсия, длительная изоляция);

– исследования с использованием искусственной петли кишечника возможности включения аллогенных хемолитотрофов в микробное сообщество толстого кишечника.

Выводы

1. Реализация лунной программы сопряжена со значительными инфекционными рисками для человека.

2. Принципы обеспечения микробиологической безопасности человека основываются на примате профилактических мер, основанных на использовании экологически комплиментарных средств, главным образом пробиотиков, основанных на аутологичных штаммах и ассоциациях микроорганизмов протективных групп. Для их оценки должны быть проведены дополнительные исследования в экспериментах с участием человека, имитирующих воздействие ряда факторов космического полета (изоляция, иммерсия, гипокинезия).

3. Для полной оценки микробиологических рисков должны быть проведены дополнительные исследования, главным образом экзобиологической направленности, позволяющие разработать и оценить меры профилактики.

4. Для обеспечения микробиологической безопасности необходимо проведение серии опережающих исследований in vitro с использованием дополнительной стендовой базы (искусственная петля кишечника и др.).

Заключение

К настоящему времени более ясным становится понимание роли микробиоты человека в поддержании состояния здоровья и развитии заболеваний. При этом микробиота сама находится под влиянием различных факторов, таких как стресс, диета, лекарственные препараты, антибиотики, ксенобиотки, пребиотики, пробиотики и т. д. [100].

Понятно, что организм хозяина обладает собственными механизмами регуляции функций, а гнотобионтные животные жизнеспособны, тем не менее мы не можем не принимать во внимание значение микробиома. Тот факт, что в организме человека есть рецепторы к метаболитам бактерий, является существенным в пользу поддержания идеи о суперорганизме или холобионте. Большое количество исследований демонстрируют участие бактерий в регуляции энергетического обмена, функций ЦНС и периферической нервной системы, артериального давления, благодаря синтезу короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), влиянию на синтез серотонина в энтерохромаффинных клетках, обмену желчных кислот.

При дисбиозе снижается продукция КЦЖК и повышается продукция уремических токсинов и протеаз, что способствует повышению проницаемости стенки кишечника и транслокации ЛПС. Неблагоприятные изменения кишечной микробиоты, связанные с появлением несвойственных (аллохтонных) видов бактерий, также приводят к увеличению количества ЛПС. ЛПС активирует TLR4, а следующая за этим стимуляция NF-kB фактора приводит

к продукции провоспалительных цитокинов и в дальнейшем к активации нейтрофилов и макрофагов. Развитие воспаления усиливает окислительный стресс, увеличивая синтез активных форм кислорода и азота. Дисбактериоз и воспаление приводят к дальнейшему нарушению межэпителиальных контактов, прогрессии транслокации ЛПС и пептидогликана и метаболической эндотоксемии. Возникает системное воспаление, являющееся важнейшим звеном в патогенезе таких патологических состояний, как сахарный диабет, атеросклероз, заболеваний, связанных с нейровоспалением.

Таким образом, в диагностике и лечении таких заболеваний мишенью становится микробиом. Однако имеющиеся проблемы препятствуют решению задач, стоящих перед медициной по диагностике и лечению ряда заболеваний. Анализ метегеномных данных не всегда может быть проведен эффективно из-за недостаточности расшифрованных и идентифицированных последовательностей бактериальных ДНК в базах генетических данных. Отсутствие эталонного генома для поиска гомологических последовательностей является основным фактором ограничения таксономической идентификации выявленной последовательности ДНК [55], которая может принадлежать ранее неизвестным микроорганизмам. Вместе с тем новые таксоны микроорганизмов, населяющих организм человека, имеют потенциальные последствия для здоровья. Они могут оказаться причиной острых или хронических заболеваний, которые до настоящего времени имеют неизвестную этиологию и могут быть использованы для ранней предсимптоматической диагностики болезни [88]. Открытым остается вопрос и об идентификации генов микроорганизмов и метаболических путей в микробиоме, ассоциированных с физиологическими функциями хозяина, что является критически необходимым для понимания взаимодействия в системе хозяин-микробиом в норме и при патологии [55,69]. Решение этих проблем связано с развитием омиксных технологий (метагеномики, транскриптомики, метаболомики и протеомики), биоинформатики и междисциплинарных исследований в областях генетики, молекулярной биологии, микробиологии и физиологии.

Список литературы:

1. *Андреева Е.А., Костров С.В., Носовская Е.А. и др.* Влияние повышенного давления и измененной газовой среды на биологические свойства микроорганизмов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2000; 4:20–24.
2. *Батов Н.Д., Новикова Н.Д., Мухамедиева Л.Н. и др.* Микрофлора человека в условиях применения аутопробиотиков на основе Enterococcus faecium при 105-суточной изоляции. Авиакосмическая и экологическая медицина 2010; 44(4):52–52.
3. *Викторов А.Н., Ильин В.К., Поликарпов Н.А. и др.* Микробиологические аспекты обитаемости глубоководных барокомплексов. Косм. биология и авиакосмическая медицина 1991; 6:10–14.
4. *Воложин А.И., Максимовский Ю.М, Ильин В.К., и др.* Разработка и применение пародонтальной повязки из коллагена и суспензии клеток Lactobacillus casei 37 в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта (микробиологические исследования). Стоматология 2004; 83(6):6–11.
5. *Воложин А.И., Царев В.Н., Ильин В.К., Сакварелидзе И.В.* Состояние местного иммунитета и микрофлоры полости рта у космонавтов, совершивших полет

на международной космической станции. Российский стоматологический журнал 2005; 4:14–17.

6. *Григорьев А.И., Новиков А.М., Павлов Б.Н. и др.* Обеспечение жизнедеятельности человека в замкнутых экосистемах с искусственной газовой средой. Экология и промышленность России. 2003; 5:4–7.

7. *Ильин В.К., Афонин Б.В., Комиссарова Д.В. и др.* Исследование влияния изменений микрофлоры кишечника и профилактического приема пробиотиков на функциональное состояние желудка в изоляционном эксперименте. Авиакосмическая и экологическая медицина 2021; 55(1):19–24.

8. *Ильин В.К., Бояринцев В.В., Комиссарова Д.В. и др.* Анализ изменения состояния влагалищной микрофлоры у женщин репродуктивного возраста в условиях трехсуточной «сухой» иммерсии без использования средств профилактики. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2021; 98(6):651–663.

9. *Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В.* Колонизационная резистентность организма в искусственной среде обитания Москва, Наука, 2005. 275 с.

10. *Ильин В.К., Кирюхина Н.В.* Применение пробиотиков в комплексной терапии дисбиотических изменений ротоглотки, развивающейся на фоне иммуносупрессии Здравоохранение Таджикистана 2010; 2(2):66–68.

11. *Ильин В.К., Кирюхина Н.В.* Синдром нарушения колонизационной резистентности у человека в искусственной среде обитания и его профилактика Acta Naturae 2014; 2(21):11–20.

12. *Ильин В.К., Кирюхина Н.В., Усанова Н.А. и др.* Факторы микробиологического риска и обоснование подходов к обеспечению противоинфекционной безопасности экипажей межпланетных космических полетов и лунных баз. Авиакосмическая и экологическая медицина 2018; 52(6):7–18.

13. *Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Афонин Б.В. и др.* Влияние приема пробиотиков в составе напитка брожения на микрофлору кишечника, слизистых оболочек и состояние желудочно-кишечного тракта человека. Авиакосмическая и экологическая медицина 2022; 56(3):47–53.

14. *Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А., Морозова Ю.А.* Исследования микрофлоры профессиональных испытуемых и волонтеров в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 20 суток. Авиакосмическая и экологическая медицина 2021.55(3):57–61.

15. *Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Усанова Н.А. и др.* Исследования микрофлоры профессиональных испытуемых и волонтеров в длительных гермокамерных экспериментах. Авиакосмическая и экологическая медицина 2022; 76(1):62–67.

16. *Ильин В.К., Ленцнер А.А., Смирнов С.К.* Анализ видового и количественного состава лактобацилл, выделенных у людей в 30-суточном эксперименте с изоляцией. Авиакосмическая и экологическая медицина 2010; 44(3):38–41.

17. *Ильин В.К., Орлов И.О., Рыкова М.П. и др.* Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образраспознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2021; 98(1):36–45.

18. *Ильин В.К., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Соловьева З.О., Носовский А.М.* Исследование тканей пародонта при моделировании фактора невесомости. Авиакосмическая и экологическая медицина 2020; 54(1):79–83.

19. *Ильин В.К., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Соловьева З.О., Скедина М.А., Ковалева А.А.* Исследование физиологических и микробиологических особенностей пародонта человека в эксперименте «сухая иммерсия». Авиакосмическая и экологическая медицина 2020; 54(1):112–117.

20. *Ильин В.К., Рыкова М.П., Антропова Е.Н. и др.* Состояние тканей пародонта в условиях длительной изоляции в гермозамкнутом объекте. Авиакосмическая и экологическая медицина 2021; 55(5):19–24.

21. *Ильин В.К., Солдатов П.Э., Соловьева З.О., и др.* Влияние среды с повышенным парциальным давлением аргона и азота на морфологические свойства колоний Escherichia coli. Авиакосмическая и экологическая медицина 2005; 39(4):62–64.

22. *Ильин В.К., Солдатов П.Э., Соловьева и др.* Влияние повышенного парциального давления аргона и азота на частоту передачи R-плазмиды Escherichia coli. Авиакосмическая и экологическая медицина 2005; 39(3):56–57.

23. *Ильин В.К., Соловьева З.О.* Влияние аргонсодержащих газовых сред при повышенном давлении на состав микрофлоры носоглотки и наружного уха операторов и ее чувствительность к антибиотикам. Авиакосмическая и экологическая медицина 2003; 37(3):28–31.

24. *Ильин В.К., Суворов А.Н., Кирюхина Н.В. и др.* Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания. Вестник Российской Академии медицинских наук 2013; 2:56–62.

25. *Ильин В.К., Усанова Н.А., Комиссарова Д.В. и др.* Сочетанное использование напитков брожения на основе сахаромицета и пробиотических и аутопробиотических препаратов для обеспечения нормализации микрофлоры человека в изоляционном эксперименте SIRIUS18/19. Авиакосмическая и экологическая медицина 2020; 54(3):49–53.

26. *Ильин В.К., Царёв В.Н., Прокопович Л.С. и др.* Обоснование создания и применения пробиотических средств профилактики воспалительных заболеваний ротоглотки человека в искусственной среде обитания. Авиакосмическая и экологическая медицина 2019; 53(4):47–52.

27. *Ильин В.К., Царев В.Н., Скедина М.А. и др.* Состояние барьеров микробной колонизации зубочелюстной системы в условиях имитированной невесомости. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2020; 64(1):76–83.

28. *Ильин В.К., Шумилина Г.А., Соловьева З.О. и др.* Некоторые показатели состояния полости рта и зубов космонавтов при полетах на МКС. Авиакосмическая и экологическая медицина 2016; 50(6):25–30.

29. *Кирюхина Н.В., Ильин В.К., Морозова Ю.А.* Применение метода микробной имплантации в целях коррекции микрофлоры верхних дыхательных путей. Авиакосмическая и экологическая медицина 2013; 47(4):70–71.

30. *Крюков А.И., Воложин А.И., Истранов Л.П. и др.* Экспериментальное обоснование применения пробиотических препаратов в условиях гидроневесомости. Вестник оториноларингологии 2007; 4:30–33.

31. *Крюков А.И., Ильин В.К., Истранов Л.П. и др.* Влияние краткосрочного применения лактосодержащего пробиотика на микрофлору глотки здоровых лиц. Вестник оториноларингологии 2008; 5:51–53.

32. *Крюков А.И., Ильин В.К. Воложин А.И. и др.* Исследование дисбиоза, развивающегося в условиях «сухой» иммерсии, и методы его коррекции. Авиакосмическая и экологическая медицина 2008 ;42(5):70–74.

33. *Носовский А.М., Ильин В.К.* Применение метода главных компонент для оценки однородности результатов исследований микрофлоры, обследуемых в условиях «сухой» иммерсии. Биомедицинская радиоэлектроника 2012; 2:42–47.

34. *Носовский А.М., Соловьева З.О., Гордиенко К.В., Ильин В.К.* Применение дисперсионного анализа при исследовании тканей пародонта в условиях эксперимента «сухая» иммерсия. Биомедицинская радиоэлектроника 2020; 23(2):22–27.

35. *Носовский А.М., Соловьева З.О., Ильин В.К.* Применение дисперсионного анализа для оценки изменения иммунологических показателей в десневой жидкости

космонавтов при длительных космических полетах и обследуемых в условиях «сухой» иммерсии. Научное обозрение 2017;1:117–122.

36. *Скедина М.А., Соловьева З.О., Ковалева А.А., Ильин В.К.* Исследование факторов пародонта при моделировании условий микрогравитации. Регионарное кровообращение и микроциркуляция 2018; 17(2):51–58.

37. *Смирнов С.К., Ильин В.К., Усанова Н.А. и др.* Исследование эффективности использования пребиотика Эубикор для профилактики дисбактериозов в отдаленном восстановительном периоде организма после γ-облучения. Авиакосмическая и экологическая медицина 2016; 50(3):30–34.

38. *Смирнов С.К., Ильин В.К., Усанова Н.А., Орлов О.И.* Влияние профилактического приема пребиотика Эубикор на состояние микрофлоры в эксперименте с изоляцией. Авиакосмическая и экологическая медицина 2016; 50(2):53–57.

39. *Соловьева З.О., Ильин В.К., Носовский А.М., Каминская Е.В.* Изменения микробиологических показателей покровных тканей, обследуемых в условиях 520-суточной изоляции. Биомедицинская радиоэлектроника 2013; 3:53–57.

40. *Соловьева З.О., Скедина М.А. Ильин В.К. и др.* Применение дисперсионного анализа для оценки изменения микрофлоры покровных тканей космонавтов и кандидатов в космонавты при длительных космических полетах. Биомедицинская радиоэлектроника 2014; 1:16–22.

41. *Усанова Н.А., Морозова Ю.А., Носовский А.М., Ильин В.К.* Опыт использования аутопробиотиков на основе энтерококков и лактобацилл в экспериментах с длительной изоляцией и в условиях «сухой» иммерсии. Авиакосмическая и экологическая медицина 2018; 52(5):34–38.

42. *Царев В.Н., Воложин А.И., Ипатов Е.В. и др.* Перспективы создания эубиотических препаратов на основе вейлонелл и стрептококков для повышения колонизационной резистентности тканей полости рта. Российская стоматология 2009; 1:35–42.

43. *Álvarez J., Real J.M.F., Guarner F., et al.* Gut microbes and health. Gastroenterología y Hepatología (English Edition) 2021; 44(7):519–535.

44. *Bäckhed F., Fraser C.M., Ringel Y. et al.* Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. Cell Host Microbe 2012; 12:611–622.

45. *Bhatt AP,* Redinbo MR, Bultman SJ (2017) The role of the microbiome in cancer development and therapy. CA Cancer J Clin 67(4):326–344.

46. *Bhattacharjee, S., and Lukiw, W. J.,* Alzheimer's disease and the microbiome. Front Cell Neurosci 2013; 7:1–4.

47. *Bindels L.B., Dewulf E.M., and Delzenne N.M.* GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. Trends in Pharmacological Sciences 2013; 34(4):226–232.

48. *Bolognini D., Dedeo D., Milligan G.* Metabolic and inflammatory functions of short-chain fatty acid receptors. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 2021;16:1–9.

49. *Carretta M.D., Quiroga J., López R. et al.* (2021) Participation of short-chain fatty acids and their receptors in gut inflammation and colon cancer. Front Physiol 2021;12:662739.

50. *Chen Y., Zhou J., Wang L.* Role and mechanism of gut microbiota in human disease. Front Cell Infect Microbiol 2021;11:625913.

51. *Cheng W.T., Kantilal H.K., Davaman F.* The mechanism of Bacteroides fragilis toxin contributes to colon cancer formation. Malays J Med Sci 2020;27(4):9–21.

52. *Cheng Y., Ling Z., Li L.* The intestinal microbiota and colorectal cancer. Front Immunol 2020; 11:615056.

53. *Christensen L.F.B., Jensen K.F., Nielsen J. et al.* Reducing the amyloidogenicity of functional amyloid protein FapC increases its ability to inhibit α-synuclein fibrillation. ACS Omega 2019;4:4029–4039.

54. *DeBoever P., Ilyin V.K., Hanus D. et al.* Conjugation-mediated plasmid exchange between bacteria grown under space conditions. Microgravity Sci Tecnol 2007;19(5/6):138–144.

55. *Dekaboruah E., Suryavanshi M.V., Chettri D., Verma A.K.* Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. Arch Microbiol 2020; 202(8):2147–2167.

56. *Deshevaya E.A., Kachalkin A.V., Maksimova I.A. et al.* Microbiological analysis of the cloth bundle exposed on the external surface of the International Space Station over 8 years. BioNanoScience 2022;12:142–148.

57. *Dietert R.R.* Microbiome First Medicine in Health and Safety. Biomedicines 2021; 9:1099.

58. *Durack J., Lynch S.V.* The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. J Exp Med 2018; 216(1):20–40.

59. *Duttaroy A.K.* Role of gut microbiota and their metabolites on atherosclerosis, hypertension and human blood platelet function: A Review. Nutrients 2021;13:144.

60. *Friedland R.P., Chapman M.R.* The role of microbial amyloid in neurodegeneration. PLoS Pathog 2017;13:e1006654.

61. *Gao H., Liu S.* Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. Life Sciences 2017;185:23–29.

62. *Gilbert J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G. et al.* Current understanding of the human microbiome. Nat Med. 2018;24(4):392–400.

63. *Goins T.L., Lim K.S., Smith A.M. et al.* Molecular analysis of spaceflight effects on several species of microorganisms. Journal of Gravitational Physiology, 2008;16:127–130.

64. *Gomaa E.Z.* Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. Antonie van Leeuwenhoek 2020;113:2019–2040.

65. *Gonzalez-Bosch C., Boorman E., Zunszain P.A., Mann G.E.* Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease. Redox Biology 2021;47:102165.

66. *Grylls A., Seidler K., Neil J.* Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics. Biomed Pharmacother 2021;137:111334.

67. *Guldris S.C., Parra E.G., Amenós A.C.* Gut microbiota in chronic kidney disease. Nefrologia 2017; 37(1):9–19.

68. HMRGD 2022. NIH Human Microbiome Project Available at: https://www.hmpdacc.org/HMRGD/.

69. *Heintz-Buschart A. and Wilmes P.* Human gut microbiome: function matters. Trends in Microbiology 2018;26(7):563–574.

70. *Hill, J. M., and Lukiw, W. J.* Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). Front Aging Neurosci 2015;7:9.

71. *Hill M.J.* Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. Eur J Cancer Prev 1997;6(1):43–45.

72. *Hooper, L.V., and Gordon, J.I.* Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science 2001; 292:1115–1118.

73. *Huang W., Man Y., Gao C. et al.* Short-chain fatty acids ameliorate diabetic nephropathy via GPR43-mediated inhibition of oxidative sress and NF-κB signaling. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2020; 4074832.

74. *Ilyin V.K.* Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Saljut and Mir orbital stations. Acta astronautica 2005;56:445–453.

75. *Ilyin V.K., Victorov A.N. Policarpov N.A. et.al.* Microbial aspects of habitable deep diving complexes exploration. Undersea Biomedical Research 1992; 6:23–28.

76. *Ilyin V.K., Victorov A.N., Syniak Ju.E.* The problems of microbial safety in regenerative life support systems exploration. Acta Astronautica 1995; 35(9-11):573–576.

77. *Ilyin V.K. & Komissarova D.V.* On ensuring anti-infectious safety of crews of interplanetary space flights and Lunar bases. Journal of British Interplanetary Society 2021; 74:443–447.

78. *Ilyin V.K., Orlov O.I., Morozova Yu.A. et al.* Prognostic model for bacterial drug resistance genes horizontal spread in space-crews. Acta Astronautica 2022; 190:388–394.

79. *Ilyin V.K., Tiurina D.A., Usanova N.A., et al.* Space tourism and safety from infection. Journal of the British Interplanetary Society 2007; 60(11):419–425.

80. *Ilyin V.K., Victorov A.N., Solovjova Z.O., Dmitrijev V.A.* Changes in frequency of R-plasmid transport in high pressure. Journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society 1993; 20(1):75–8.

81. *Jovel J., Dieleman L.A., Kao D. et al.* The human gut microbiome in health and disease. In: Metagenomics. Perspectives, Methods, and Applications. Ed. by M. Nagarajan. Elsevere, Academic Press, 2018, Pp. 197–213.

82. *Kennedy P.J., Cryan J.F., Dinan T.G., Clarke G.* Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. Neuropharmacology 2017; 112:399e412.

83. *Kiepura A., Stachyra K., Olszanecki R.* Anti-atherosclerotic potential of free fatty acid receptor 4 (FFAR4). Biomedicines 2021; 9:467.

84. *Kilian M., Chapple I.L.C., Hannig M. et al.* The oral microbiome–an update for oral healthcare professionals. Brit Dent J 2016; 221(10):657–666.

85. *Kiryukhina N.V., Melnikov V.G., Suvorov A.V. et al.* Use of Corynebacterium pseudodiphthericum for elimination of Staphylococcus aureus from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2013; 2:233–238.

86. *Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F.* From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell 2016;165(6):1332–1345.

87. *Kosolapova A.O., Antonets K.S., Belousov M.V., Nizhnikov A. A.* Biological functions of prokaryotic amyloids in interspecies interactions: facts and assumptions. IJMS 2020; 21:7240.

88. *Kowarsky M., Camunas-Soler J., Kertesz M. et al.* Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. PNAS 2017; 114(36):9623–9628.

89. *Lia M., van Escha B.C.A.M.,* Wagenaar G.T.M. et al. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. European Journal of Pharmacology 2018; 831:52–59.

90. *Lindeboom R., Ilgrande C., Arroyo J. et al.* Nitrogen cycle microorganisms can be reactivated after Space exposure. Scientific Reports 2018; 8:1–7.

91. *Liu L., Li L., Min J. et al.* Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte derived dendritic cells. Cell Immunol 2012; 277:66–73.

92. *Liu H., Liu H., Liu C. et al.* Gut microbiome and the role of metabolites in the study of Graves' disease. Front Mol Biosci 2022; 9:150.

93. *Lymperopoulos A., Suster M.S. Borges J.I.* Short-chain fatty acid receptors and cardiovascular function. Int J Mol Sci 2022; 23:3303.

94. *Macia L., Tan J., Vieira A.T. et al.* Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. Nature Communications 2015; 6:6734.

95. *Mahmoodpoor F., Saadat Y.R., Barzegari A. et al.* The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017; 93:412–419.

96. *Martin-Gallausiaux C., Marinelli L., Blottière H.M. et al.* SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. Proceedings of the Nutrition Society 2021; 80:37–49.

97. *Miller A.L., Bessho S., Grando K., Tükel Ç.* Microbiome or infections: amyloid-containing biofilms as a trigger for complex human diseases. Front Immunol 2021; 12:638867.

98. *Miyamoto J., Kasubuchi M., Nakajima A. et al.* The role of short-chain fatty acid on blood pressure regulation. Curr Opin Nephrol Hypertens 2016; 25(5):379–383.

99. *Mirzaei R., Afaghi A., Babakhani S. et al.* Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. Biomedicine & Pharmacotherapy 2021;139:111619.

100. *Mohajeri M.H., Brummer R. J. M., Rastall R.A. et al.* The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. European Journal of Nutrition 2018; 57(Suppl 1):1–14.

101. *Mohajeri M.H., La Fata G., Steinert R.E., Weber P.* Relationship between the gut microbiome and brain function. Nutrition Reviews. 2022; 76(7):481–496.

102. *Mosterd C.M., Kanbay M., van den Born B.J.H. et al.* Intestinal microbiota and diabetic kidney diseases: the role of microbiota and derived metabolites inmodulation of renal inflammation and disease progression. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2021; 35:101484.

103. *Napier W.M., Wickramasinghe J.T, Wickramasinghe N.C.* The origin of life in comets. International Journal of Astrobiology 2007; 6(4):321–323.

104. *Otzen D., Nielsen P. H.* We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. Cell Mol Life Sci 2008; 65:910–927.

105. *Pakhomov N. and Baugh J.A.* The role of diet-derived short-chain fatty acids in regulating cardiac pressure overload. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2021; 320:475–486.

106. *Pavlov B.N., Ilyin V.K.* Conception of active target human adaptation towards hyperbaric media. Acta Astronautica 1997; 41(4–10):525–529.

107. *Pluznick J.L.* Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors. Kidney International 2016; 90:1191–1198.

108. *Priyadarshini M., Kotlo K.U., Dudeja P.K., Layden B.T.* Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology. Compr Physiol 2019; 8(3):1091–1115.

109. *Priyadarshini M., Navarro G., Layden B.T.* Gut microbiota: FFAR reaching effects on islets. Endocrinology 2018; 159(6):2495–2505.

110. *Redinbo M.R.* The microbiota, chemical symbiosis, and human disease. J Mol Biol 2014 426(23):3877–3891.

111. *Revilla-García A., Fernández C., Moreno-del Álamo M. et al.* Intercellular transmission of a synthetic bacterial cytotoxic prion-like protein in mammalian cells. MBio 2020; 11:e02937–19

112. *Ridaura V. and Belkaid Y.* Gut microbiota: the link to your second brain. Cell 2015; 161(2):193-194.

113. *Roth W., Zadeh K., Vekariya R. et al.* Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis. Int J Mol Sci 2021; 22:2973.

114. *Rydzewska-Rosołowska A., Sroka N., Kakareko K. et al.* The links between microbiome and uremic toxins in acute kidney injury: beyond gut feeling – A systematic review. Toxins 2020; 12:788.

115. Salazar J., Angarita L., Morillo V. et al. Microbiota and diabetes mellitus: role of lipid mediators. Nutrients 2020; 12:3039.

116. *Sams Clarence F., Crucian Brian E., Pierson Duane L. Immunology and Microbiology. In: Principles of Clinical Medicine for Space Flight. Ed. by Barratt M., Baker E., Pool S.* Springer, New York, NY. 2019. Pp. 659–671.

117. *Sampson T.R., Challis C., Jain N. et al.* A gut bacterial amyloid promotes α-synuclein aggregation and motor impairment in mice. Elife 2020; 9:e53111.

118. *Schertzer J.D., Lam T.K.T.* Peripheral and central regulation of insulin by the intestine and microbiome. Am J Physiol Endocrinol Metab 2021; 320:234–239.

119. *Schieber A.M., Lee Y.M., Chang M.W. et al.* Disease tolerance mediated by microbiome E. coli involves inflammasome and IGF-1 signaling. Science 2015; 350(6260):558–63.

120. *Seira Curto J., Surroca Lopez A., Casals Sanchez M. et al.* Microbiome impact on amyloidogenesis. Front Mol Biosci 2022; 9:926702.

121. *Sivaprakasam S., Prasad P.D., Singh N.* Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. Pharmacol Ther 2016; 164:144–151.

122. *Slobodkin A., Gavrilov S., Ionov V., Ilyin V.* Spore-forming thermophylic bacterium within artificial meteorite survives entry into the earth atmosphere on Foton M4 satellite landing module. Plos One 2015; 10(7):1–13.

123. *Subedi S., Sasidharan S., Nag N., et al.* Amyloid cross-seeding: mechanism, implication, and inhibition. Molecules 2022; 27;1776.

124. *Taing K., Chen L., Weng H.-R.* Emerging roles of GPR109A in regulation of neuroinflammation in neurological diseases and pain. Neural Regen Res 2023; 18(4):763–768.

125. *Thomas S., Izard J., Walsh E. et al.* The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists. Cancer Res 2017; 77: 1783–1812.

126. *Ubeda C., Djukovic A., Isaac S.* Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. Clin Transl Immunology 2017; 6(2):e128.

127. *Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W.,* Knight R. Defining the human microbiome. Nutr Rev 2012; 70(1):S38–S44.

128. *Usuda H., Okamoto T., Wada K.* Leaky gut: effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier. Int J Mol Sci 2021; 22:7613.

129. *Vaneyck J., Segers-Nolten I., Broersen K., Claessens M. M. A. E.* Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid fibrils of food proteins. J Biol Chem 2021; 296:100358.

130. *Verhaar B.J.H., Prodan A., Nieuwdorp M.,* Muller M. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review. Nutrients 2020; 12:2982.

131. *Victorov AN, Ilyin VK, Policarpov NA et al.* Microbiologic hazards for inhabitants of deep diving hyperbaric complexes. Undersea Biomed Res 1992; 19(3):209–213.

132. *Weiss G. A., Hennet T.* Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. Cell Mol Life Sci 2017; 74:2959–2977.

133. *Wilkins L.J., Monga M., Miller A.W.* Defining dysbiosis for a cluster of chronic diseases. Sci Rep 2019; 9:1–10.

134. *Zeng M.Y., Cisalpino D., Varadarajan S. et al.* Gut microbiota induced immunoglobulin G controls systemic infection by symbiotic bacteria and pathogens immunity 2016; 44(3):647–58.

135. *Zhu W., Gregory J.C., Org E. et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. Cell 2016; 165:111–124.

Глава 15. КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ПРИЗНАКИ И ПРИРОДА РАКА

А.А. Богданов, Н.М. Волков, В.А. Чубенко, В.В. Егоренков, Ф.В. Моисеенко, В.М. Моисеенко

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), количество онкологических пациентов постоянно увеличивается и злокачественные новообразования являются одной из лидирующих причин смертности в мире (около 17% всех умерших) [1]. Колоссальный прогресс, достигнутый в последние десятилетия в исследовании рака, убедительно показывает сложность этой болезни и вместе с тем открывает огромные возможности для понимания физиологии злокачественных опухолей и борьбы с ними.

Нормальные клетки, подвергаясь жесточайшей регуляции в организме, образуют новые только по мере необходимости в них. Старея или неся повреждения, нормальные клетки умирают и замещаются новыми. В то же время злокачественная опухоль, начинаясь практически в любом месте организма, не только способна к бесконтрольному росту за счет клеточного деления, но и к распространению как в близлежащие, так и в отдаленные ткани и органы. Инвазия опухолевых клеток в окружающие ткани и их метастазирование являются основной причиной смерти большинства онкологических больных [2-4].

Сложность физиологии рака отражена в многочисленных теориях, пытающихся объяснить его происхождение и развитие [5]. Теория соматических мутаций (ТСМ), являющаяся доминирующей в изучении канцерогенеза в течение многих лет, говорит о том, что рак возникает из-за накопления ряда мутаций в онкогенах или генах-супрессорах. Это приводит к усилению пролиферации, уменьшению гибели клеток и клональной экспансии [6-8]. Однако многие явления не могут быть объяснены ТСМ, в частности возможность инициации рака химическими веществами, не являющимися мутагенами, потеря индуцирующей мутации (например, в опухолях у трансгенных мышей), инфекционные причины рака, регрессия злокачественных опухолей [9]. Кроме этого, трудно представить, что ТСМ может объяснить систематическое поведение опухолевых клеток, эволюцию и свойства рака только за счет накопления мутаций как в онкогенах, так и в генах-супрессорах. Соответственно, создаются другие альтернативные модели, объясняющие канцерогенез на основе различных дефектов нормальных физиологических процессов. Среди них:

- теория тканевой реорганизации, говорящая о том, что пролиферация является состоянием по умолчанию для всех клеток, а канцерогенез – заболеванием тканевой организации, сравнимым с органогенезом [10];
- атавистическая теория рака, которая постулирует, что отличительные свойства злокачественной опухоли уже существуют в нормальных клетках

и представляют собой способность возврата к древней программе выживания (клетка против организма) [11, 12];

- теория раковых стволовых клеток, определяющая раковые стволовые клетки как клетки, инициирующие опухоль, которые обладают стволовыми характеристиками – способностью к самообновлению и образованию гетерогенных клонов клеток, составляющих опухоль [13];
- метаболическая теория на основе работы Варбурга [14], в которой рак рассматривается как заболевание нарушенного метаболизма, при котором митохондрии играют ключевую роль в онкогенезе [4, 15].

В целом, начиная с 70-х годов XX века, злокачественные клетки характеризовались двумя основными признаками – игнорированием сигналов и механизмов, которые контролируют пролиферацию и гибель, и способностью ускользать от иммунной системы («эксцесс роста автономного характера»). Суммарно это приводит к аберрантной, сложной и эффективной автономной пролиферации клеток [16].

Отличительные признаки рака

Независимо от локализации первичной опухоли в организме существуют общие патофизиологические процессы возникновения и развития злокачественных опухолей. Общепризнанной основой патогенеза рака является повреждение генетического аппарата клеток. Считается, что повреждение генетического аппарата клетки наряду с эпигенетической инактивацией противоопухолевых генов имеет существенное значение в патогенезе опухолей. При этом следует учитывать, что инактивация гена онкосупрессора является одной из естественных физиологических реакций организма, и когда эта реакция становится патофизиологическим состоянием организма, это приводит к развитию рака.

В 2000 году Ханахан и Вайнберг впервые обобщили и классифицировали отличительные признаки, приобретаемые раковыми клетками и способствующие их выживанию, пролиферации и диссеминации:

- устойчивость пролиферативных сигналов,
- уклонение от супрессоров роста,
- обеспечение репликативного бессмертия,
- активация инвазии и метастазирования,
- индукция ангиогенеза,
- противодействие клеточной гибели [7].

В 2011 г. к этим шести признакам рака были добавлены 2 отличительные особенности – нарушение регуляции клеточного метаболизма, уклонение от разрушения иммунной системой и два активирующих фактора – воспаление и нестабильность генома [8].

Устойчивость пролиферативных сигналов

Определяющим критерием злокачественных опухолей является хроническая неадекватная клеточная пролиферация, возникающая в результате повреждения регуляторных клеточных путей, которые обычно временно организуют пролиферацию клеток во время эмбрионального развития, физиологического роста и гомеостатического поддержания тканей по всему организму. Как положительные (индуктивные), так и отрицательные (репрессивные) сигналы

управляют делением и пролиферацией клеток. При раке стимулирующие сигналы активируются и поддерживаются постоянно.

Наиболее хорошо установленный и широко распространенный механизм поддержания пролиферативных сигналов включает мутационное изменение генов опухолевых клеток, переводящих их в активные драйверы клеточной пролиферации. Эти активированные гены, определяемые как онкогены, делают временные сигналы, обеспечивающие физиологическую пролиферацию, постоянными. Такие онкогены обычно кодируют белки с измененной структурой и функцией или количеством по сравнению с их нормальными клеточными аналогами, которые отвечают за получение пролиферативных сигналов из внеклеточных источников и передачу сигналов через сложные регуляторные цепи, действующие внутри клетки.

Примером мутировавших онкогенов-драйверов, которые поддерживают пролиферативную передачу сигналов при раке, являются рецептор эпидермального фактора роста (EGF) и преобразователи сигналов в нижестоящем пути RAS-RAF-MEK-MAPK, которые обрабатывают и передают стимулирующие рост сигналы через последовательное белковое фосфорилирование в ядерный аппарат клетки [17]. При многих формах рака обнаруживают мутации, которые делают тот или иной из этих белков постоянно активнным, включая EGFR и родственные рецепторные тирозинкиназы, такие как HER2 и ALK. Аналогично действующие мутации приводят к хронической активации нижестоящих преобразователей сигналов, например KRAS, BRAF и MEK [18]. Заметим, однако, что активация в раковых клетках этого центрального митогенного пути не всегда зависит от генетических изменений, приобретенных в ходе опухолевой прогрессии. В некоторых случаях эпигенетическая дерегуляция аутокринных (аутостимулирующих) и паракринных (межклеточных) сигнальных цепей также может обеспечивать раковые клетки хроническими сигналами, стимулирующими рост, при очевидном отсутствии лежащих в их основе соматических мутаций.

Уклонение от супрессоров роста

Существенным противовесом пролиферативным сигналам в нормальных клетках являются механизмы торможения, которые либо подавляют инициацию, либо, впоследствии, блокируют процесс клеточного деления, запускаемый пролиферативными сигналами. Гены, кодирующие эти белки, часто называют генами-супрессорами опухолей. Наиболее заметными супрессорами являются прямые регуляторы прохождения клеточного цикла – белок ретинобластомы (pRb) и ингибиторы циклин-зависимых киназ [19]. Активность этой системы молекулярного торможения обычно регулируется интеграцией внеклеточных стимулирующих и противодействующих росту сигналов, передаваемых рецепторами на клеточной поверхности, наряду с мониторами внутриклеточного физиологического состояния клетки, чтобы регулировать тканевый гомеостаз и управлять транзиторной физиологической пролиферацией.

Система внутриклеточного мониторинга построена вокруг белка p53 и служит для обеспечения продвижения клетки по клеточному циклу только тогда, когда физиологическое состояние клетки является подходящим. Таким образом, p53 выявляет неустраненные повреждения генома клетки, а также стрессовые физиологические дисбалансы, которые могут нарушить точную дупликацию

генома, хромосомную сегрегацию и деление клеток. В ответ на сигналы клеточного стресса p53 активирует ингибиторы аппарата клеточного цикла. В случаях серьезного повреждения генома или стрессовых физиологических аномалий p53 и его комплексы индуцируют запрограммированную гибель клеток как крайнюю форму торможения пролиферации клеток [19].

Генетическое профилирование геномов и транскриптомов указывает на то, что большинство опухолей человека содержат дефекты (генетические или эпигенетические) в функциях опухоль-супрессорных путей Rb и p53 [20]. Уклонение от супрессоров роста является отличительной чертой, необходимой для обеспечения того, чтобы продолжающаяся пролиферация раковых клеток и последующий рост опухоли не останавливались тормозными механизмами, которые в нормальных условиях ограничивают степень пролиферации клеток для поддержания тканевого гомеостаза.

Противодействие клеточной гибели

В нормальных условиях существует барьер для аберрантной клеточной пролиферации, включающий в себя внутренние клеточные механизмы, которые запускают запрограммированную гибель клеток, считающихся либо аберрантными, либо излишними, в случае нормального развития и гомеостаза. Наиболее известной формой запрограммированной гибели клеток является *апоптоз*. Программа апоптоза может быть запущена внутренними или внеклеточными автономными сигналами, которые обнаруживают различные формы клеточных аномалий. Программа апоптотической гибели клеток включает направленную деградацию хромосом и других важных клеточных органелл с помощью специализированных ферментов (например, каспаз), сморщивание и фрагментацию клетки, а также ее поглощение либо соседними клетками, либо фагоцитами [21].

Быстрое поглощение апоптотических телец гарантирует, что их гибель не высвобождает субклеточные компоненты, которые в противном случае спровоцировали бы иммунный ответ (отметим, что недавно была описана форма апоптоза – иммуногенный апоптоз, или иммуногенная гибель клеток, индуцированная определенным набором химиотерапевтических препаратов или методами физической терапии, такими как ионизирующее облучение и фотодинамическая терапия) [22]. Это «иммунное молчание» контрастирует со второй формой запрограммированной гибели клеток – *некроптозом*. Давно известный как некроз и предполагавшийся как пассивное растворение умирающей клетки некроз также может быть активным запрограммированным процессом, который управляется клеточными регуляторами и эффекторами, отличными от регуляторов апоптоза. Некроптоз может быть вызван различными состояниями, в том числе кислородным и энергетическим голоданием, вирусной инфекцией и воспалением. Клетки, погибающие в результате некроптоза (или пассивного некроза), разрываются, высвобождая свое содержимое и оставляя свои каркасы в виде иммуногенного мусора, который может вызвать (или усугубить) иммунный воспалительный ответ, а также привести как к опухоль-стимулирующим, так и противоопухолевым реакциям [23].

Третья программа, способная вызвать гибель клеток, называемая *аутофагией*, служит системой рециркуляции клеточных органелл, которая может помочь клеткам реагировать на условия лишения питательных веществ путем деградации несущественных клеточных компонентов. Таким образом, аутофагия

генерирует метаболиты и питательные вещества, необходимые для выживания и роста, которые клетки не могут получить из своего окружения. Кроме этого, лишение питательных веществ или другие острые клеточные стрессы могут привести к гиперактивации аутофагической рециркуляции, что приводит клетку к точке невозврата, в которой ее набор органелл падает ниже минимально необходимого уровня для жизнеспособности. Как следствие, клетка умирает в результате «аутофагической» гибели, отличающейся по своим характеристикам как от апоптоза, так и от некроптоза. Другими словами, в зависимости от физиологического состояния опухолевой клетки аутофагия может либо поддерживать ее выживание и способствовать дальнейшей пролиферации, либо устранять ее посредством гибели [24].

Злокачественные клетки разными способами обходят эти три различных механизма запуска клеточной гибели для продолжения своей пролиферативной экспансии и фенотипической эволюции до состояния повышенной злокачественности.

Обеспечение репликативного бессмертия

Одним из важных барьеров для бесконтрольной пролиферации клеток являются теломеры, которые расположены на концах хромосом и регистрируют количество последовательных клеточных поколений, которые прошел клеточный клон. Это происходит за счет постепенного уменьшения их длины во время каждого цикла клеточного деления.

Теломеры состоят из тысяч тандемных копий определенной гексануклеотидной последовательности ДНК, расположенных на концах каждой хромосомы и связанных со специализированным набором ДНК-связывающих белков. Работая вместе, эти нуклеопротеиновые комплексы защищают концы хромосом как от деградации механизмом репарации ДНК, предназначенным для обнаружения повреждений ДНК, так и от сквозных слияний с другими хромосомами, катализируемых обнаженными концами ДНК [25].

Примечательно, что когда количество повторов теломер становится ниже определенного порога, срабатывает механизм, вызывающий остановку клеточного цикла, или апоптоз, опосредованный p53, который исполняет свою функцию, обнаруживая повреждение ДНК [26]. Обход этих p53-индуцированных антипролиферативных ответов (например, путем мутационной инактивации гена p53) позволяет злокачественным клеткам с разрушающимися теломерами игнорировать порог и продолжать пролиферировать, но только временно. Рано или поздно продолжающееся разрушение теломерной ДНК приводит к потере защитных нуклеопротеиновых колпачков, защищающих концы хромосомной ДНК. Это делает возможными слияние хромосом конец в конец, циклы разрыв-слияние-мостик во время митоза, результатом чего являются хаос кариотипа и последующая гибель клетки [27].

Злокачественные клетки во многих полностью сформированных опухолях преодолевают пролиферативный барьер, образованный эрозией теломер и неминуемой митотической катастрофой дисфункции теломер, активируя систему поддержания и удлинения теломер, которая обычно используется для сохранения репликативной способности нормальных эмбриональных и тканевых стволовых клеток. Эта система включает экспрессию фермента, удлиняющего теломеры, называемого теломеразой [28]. Реже они задействуют альтернативный

механизм, основанный на межхромосомной рекомбинации, для сохранения длины теломер [29]. Таким образом, с помощью той или иной стратегии раковые клетки приобретают способность сохранять свои теломеры, избегая лимита их укорочения, тем самым обеспечивая неограниченный репликативный потенциал («клеточное бессмертие»), который необходим для продолжающегося расширения популяций раковых клеток.

Индукция ангиогенеза

Как и нормальные органы, опухоли требуют постоянного снабжения кислородом, глюкозой и другими питательными веществами, а также удаления метаболических «отходов», чтобы поддерживать жизнеспособность и пролиферацию клеток. Этим целям служит сосудистая сеть, связанная с опухолью. Вредное воздействие, которое ишемия оказывает на нормальные ткани, хорошо установлено клинически и экспериментально: клетки погибают в результате той или иной формы запрограммированной гибели клеток, вызывая деградацию и дисфункцию тканей и органов. Точно так же рост развивающихся опухолевых очагов приостанавливается, когда их способность усваивать переносимые кровью питательные вещества становится недостаточной. Это происходит, когда ближайший капилляр находится на расстоянии более 200 микрон. При этом активируется ангиогенез – образование новых кровеносных сосудов. Клетки на пределе диффузии из ближайшего капилляра активируют различные системы реакции на стресс, из которых наиболее значимы факторы транскрипции, индуцируемые гипоксией (HIF), регулирующие сотни генов, включая те, которые прямо или косвенно индуцируют ангиогенез и другие адаптивные возможности. Подобно клеткам в ишемизированных тканях, раковые клетки, которым не хватает достаточного количества кислорода и глюкозы, обычно погибают в результате некроза/некроптоза, апоптоза или аутофагии. Это объясняет, почему большинство быстро растущих опухолей хорошо васкуляризированы и имеют признаки продолжающегося ангиогенеза [30].

Следует отметить, что опухолевая сосудистая сеть обычно аберрантна как морфологически, так и функционально [31]. Кровеносные сосуды опухоли извиты, расширены и негерметичны, с неустойчивым характером кровотока и «мертвыми зонами», в которых кровоток не определяется, что резко контрастирует с бесперебойным кровотоком в нормальной сосудистой сети. Кроме того, степень васкуляризации широко варьируется от одного типа опухоли к другому, начиная от интенсивно васкуляризированной почечной карциномы до плохо васкуляризированной аденокарциномы протоков поджелудочной железы [32].

Также необходимо отметить, что хотя постоянный ангиогенез является отличительной чертой большинства солидных опухолей, некоторые из них могут использовать альтернативные способы получения доступа к сосудистой сети [33]. В имеющих высокую васкуляризацию тканях мозга, печени и легкого опухолевые клетки могут пролиферировать и расти вдоль нормальных капилляров, создавая «рукава», внешний диаметр которых определяется пределом диффузии в 200 мкм [34, 35].

Активация инвазии и метастазирования

Программы инвазивного роста позволяют раковым клеткам внедряться в соседние ткани, а также в кровеносные и лимфатические сосуды (интравазация).

Эти сосуды впоследствии служат проводниками для распространения к близлежащим и отдаленным анатомическим зонам. Лимфатическая сосудистая сеть, дренирующая ткани, транспортирует раковые клетки в лимфатические узлы, где могут образовываться метастазы. Такие клеточные колонии могут распространяться с кровотоком. Клетки, попадающие в кровоток путем прямой интравазации внутри опухоли или опосредованно через лимфатические узлы, могут задерживаться в микрососудах отдаленных органов и экстравазировать через стенки сосудов в паренхиму органа-мишени. Возникающие микрометастазы могут дать начало в последующем клинически определяемому метастазу, погибнуть или находиться в состоянии покоя (senescence) [36, 37].

Регуляция взаимосвязанных способностей к инвазии и метастазированию чрезвычайно сложна, включая как внутренние клеточные программы, так и помощь клеток из микроокружения. Заметной среди внутренних механизмов регуляции раковых клеток является активация в эпителиальных раковых клетках программы эпителиально-мезенхимального перехода [38]. Последняя заключается в приобретении опухолевыми эпителиальными клетками фенотипических признаков мезенхимальных клеток. В физиологических условиях этот феномен обеспечивает миграцию и инвазию клеток в процессе органогенеза. Взаимосвязанная регуляторная программа, индуцируемая микроокружением в некоторых опухолях, представляет собой систему ответа на гипоксию, которая запускает активацию HIF, HIF1α и HIF2α, в результате чего изменяется экспрессия сотен генов [39, 40], включая компоненты программы эпителиально-мезенхимальной трансформации. Эти системы регуляции контролируют гены, которые контролируют в том числе интравазацию, а также выживание трансформированных эпителиальных клеток в кровеносном русле. Примечательно, что приобретение этой отличительной способности может происходить в различных точках путей многоступенчатого развития и прогрессирования опухоли. В некоторых случаях приобретение метастатического фенотипа происходит поздно, отражая мутационную или эпигенетическую эволюцию раковой клетки. В других случаях эта способность приобретается рано, так что многие раковые клетки в опухоли уже могут быть способны к инвазии и метастазированию на самых ранних этапах опухолевой прогрессии. Более того, есть указания на то, что в некоторых случаях программа эпителиально-мезенхимальной трансформации может быть временно активной и функционально важной для диссеминации, но затем отключаться в макрометастатических клонах [41, 42]. Остается неясным, полезны ли приобретенные признаки инвазии и метастазирования и, следовательно, активно ли они отбираются в ходе эволюции первичных опухолей. Альтернативно, эти способности, определяющие злокачественность, могут представлять собой случайные побочные продукты активации глобальных регуляторных путей (например, передачи пролиферативных сигналов, эпителиально-мезенхимального перехода, HIF), которые первоначально выбраны, потому что они способствуют формированию первичной опухоли.

Нарушение регуляции клеточного метаболизма

Представление о том, что раковые клетки изменяют использование своих источников энергии, в частности глюкозы, для поддержания своей пролиферации, было введено в 1920-х годах Отто Варбургом, который обнаружил,

что некоторые культивируемые опухолевые клетки имеют повышенное поглощение глюкозы, которая метаболизируется посредством гликолиза в лактат даже в присутствии кислорода, тогда как в нормальных клетках происходит окислительное фосфорилирование [43, 44]. Результат, на первый взгляд, был нелогичным, поскольку гликолиз гораздо менее эффективен с точки зрения образования АТФ. Однако теперь известно, что «аэробный гликолиз», описанный Варбургом, производит, помимо АТФ, многие строительные блоки для клеточных макромолекул, которые необходимы для роста и деления клеток [45, 46]. Действительно, метаболизм раковых клеток напоминает метаболизм активно делящихся нормальных клеток. Более того, важно понимать, что в раковых клетках нет бинарного переключения с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз. Скорее, раковые клетки продолжают использовать окислительное фосфорилирование в дополнение к включению различных темпов гликолиза, пропорции которых вполне могут оказаться динамическими во времени, изменчивыми среди раковых клеток в разных субрегионах опухоли и в различных тканевых микроокружениях [45, 47].

Аэробный гликолиз можно косвенно контролировать с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием радиоактивно меченой глюкозы. ПЭТ с [18F]-фтордезоксиглюкозой обычно используют для визуализации гликолитических опухолей за счет повышенной экспрессии переносчиков глюкозы и, как следствие, увеличения поглощения глюкозы.

Хотя глюкоза является основным источником энергии, используемым большинством раковых клеток, глутамин также играет важную роль для получения энергии, а также предшественников липидов и аминокислот. В большинстве случаев глутамин, вероятно, дополняет и усиливает глюкозу в снабжении энергией и биоматериалами для роста и пролиферации раковых клеток [48].

Третьим важным источником энергии и биоматериала является лактат. Хотя долгое время лактат считался «токсичным отходом», который секретируется клетками с активным аэробным или анаэробным гликолизом, в настоящее время считается доказанным, что лактат также может использоваться опухолью [49, 50]. В некоторых опухолевых клетках, особенно в тех, которые страдают от дефицита глюкозы, внеклеточный лактат может импортироваться с помощью специфических транспортеров и использоваться в качестве материала для получения АТФ и биоматериалов. Точно так же и клетки микроокружения, в том числе опухоль-ассоциированные фибробласты, могут использовать лактат в метаболизме. Следовательно, в некоторых опухолях могут действовать метаболические симбиозы, включающие партнерство между клетками, импортирующими/экспортирующими лактат, и клетками, импортирующими лактат [51].

Пока остается нерешенным вопрос о том, является ли измененный метаболизм опухоли независимым от приведенных выше отличительных особенностей рака с точки зрения его механизмов регуляции или, наоборот, конкордантно регулируется под эгидой этих признаков. Онкогены, такие как KRAS и cMYC, а также потеря функции супрессоров, таких как p53, могут служить для перепрограммирования энергетического метаболизма раковых клеток. По этой причине перепрограммирование клеточной энергетики и метаболизма изначально было определено Ханаханом и Вайнбергом как «появляющаяся

отличительная черта» [8]. Независимо от этого, нарушение регуляции клеточного метаболизма, безусловно, является ключевым свойством неопластического клеточного фенотипа [52].

Уклонение от иммунной системы

Данная отличительная особенность рака была в центре внимания в течение последних десятилетий, первоначально задуманная как предположение, что зарождающиеся неоплазии должны найти способы обойти активный надзор со стороны иммунной системы, которая в противном случае устранила бы аберрантно пролиферирующие предраковые клетки [53]. Несмотря на то, что это четко продемонстрировано в хорошо антиген-презентирующих опухолях на мышиных моделях, общая картина иммунного надзора за начальной опухолью в качестве барьера неопластической прогрессии остается неясной. Одним из факторов является иммунная аутотолерантность: подавляющее большинство антигенов, экспрессируемых спонтанно возникающими раковыми клетками, вероятно, являются общими с антигенами, экспрессируемыми исходными клетками в нормальных тканях, и поэтому игнорируется иммунным надзором. Тем не менее некоторые раковые клетки экспрессируют антигены, к которым иммунная система не смогла развить толерантность, включая эмбриональные антигены и новые антигены, продуцируемые мутациями генома (так называемые неоантигены). Такие антигены действительно могут вызывать противоопухолевый иммунный ответ, и на них все чаще обращают внимание в стратегиях, направленных на создание эффективного противоопухолевого иммунитета [54].

Напротив, иммунный ответ на вирус-индуцируемые опухоли понятен: онкогенные вирусы экспрессируют чужеродные антигены (включая онкобелки, ответственные за трансформацию клеток), к которым иммунная система не толерантна, что приводит к гуморальным и клеточным иммунным ответам – уничтожаются инфицированные вирусом предраковые клетки и тем самым элиминируются зарождающиеся неоплазии. Тот факт, что клетки, трансформированные вирусом, могут, тем не менее, успешно уклоняться от элиминации иммунной системой, вызывая клинический рак, свидетельствует о способности таких опухолевых вирусов уклоняться от иммунной системы [55]. Тем не менее иммунная система, вероятно, служит значительным барьером для индуцированных вирусами опухолей, о чем свидетельствует повышенный уровень заболеваемости раком у людей с ослабленным по разным причинам иммунитетом, включая реципиентов органов и больных ВИЧ [56, 57].

Несмотря на вероятное отсутствие эффективного начального иммунного надзора у большинства опухолей, не ассоциированных с вирусами, различные данные свидетельствуют о том, что при некоторых типах опухолей присутствует иммунное распознавание в той или иной степени на более поздних стадиях прогрессии. Например, среди хирургических пациентов с колоректальным раком, у тех, чьи опухоли содержали инфильтраты цитотоксических Т-лимфоцитов, прогноз был лучше, чем у пациентов с опухолями аналогичной стадии и размера, но у которых было сравнительно мало инфильтрирующих цитотоксических Т-лимфоцитов. Это свидетельствует о роли иммунной системы как существенного препятствия для прогрессивного роста и диссеминации раковых клеток, которое обязательно снижается или обходится в агрессивных

типах опухолей [58]. Иммунное фенотипирование опухолей, включая ассоциированную с ними строму, оценивается как новый показатель в диагностике опухолей, который в сочетании с традиционными критериями может обеспечить более точную оценку прогноза и выбора оптимального лечения [59, 60]. Соответственно, противоопухолевый иммунный ответ целесообразно рассматривать как существенный барьер, который опухоли необходимо преодолеть при длительном многостадийном развитии. Тем не менее правила иммунного взаимодействия остаются неоднозначными при рассмотрении спектра злокачественных опухолей. Неясно, когда при различных органоспецифических путях развития опухоли привлекается внимание иммунной системы, каковы точные характеристики и эффективность результирующих иммунных ответов, какова генетическая сигнатура пациентов и опухоли, как эта сигнатура влияет на развитие противоопухолевого иммунитета.

Воспаление как активирующий фактор

Фундаментальные исследования рака расширили представление о том, что воспаление является критическим компонентом опухолевой прогрессии. Многие виды рака развиваются в местах хронической инфекции и воспаления. В настоящее время становится ясно, что микроокружение опухоли, которое в значительной степени организовано клетками воспаления, является неизменным участником неопластического процесса, способствуя пролиферации, выживанию и миграции. Кроме того, опухолевые клетки кооптировали некоторые сигнальные молекулы врожденной иммунной системы, такие как селектины, хемокины и их рецепторы для инвазии, миграции и метастазирования [61, 62].

Опухоль-стимулирующая инфильтрация иммунными клетками (воспаление) является важным механизмом, посредством которого развивающиеся раковые опухоли могут приобретать характерные признаки. Это может происходить за счет выделения инфильтрирующими клетками сигналов пролиферации и выживания, проангиогенных и других факторов, способствующих локальной инвазии и метастазированию. Большинство опухолей инфильтрированы различными типами клеток иммунной системы. Некоторые из них, такие как Т-регуляторные клетки и клетки-супрессоры миелоидного происхождения, могут активно подавлять цитотоксические Т-лимфоциты, которые направляются иммунной системой для уничтожения опухоли [63, 64].

Опухоль-стимулирующие инфильтрирующие иммунные клетки рекрутируются различными способами в разных типах опухолей и на разных стадиях многоэтапного онкогенеза. Список провоспалительных сигналов, включая хемокиновые и цитокиновые сигнальные факторы, все еще не полностью изучен. В некоторых случаях характер неопластического поражения может спровоцировать аномалии ткани или сигналы повреждения, которые привлекают инфильтрирующие иммунные клетки, представляющие адаптивную и врожденную иммунные системы. В других случаях онкогенная передача сигналов путем активации транскрипционных путей индуцирует экспрессию цитокинов и хемокинов. Некоторые эксперименты показывают, что инфильтрирующие иммунные клетки могут участвовать в процессе метастазирования, соединяясь с раковыми клетками, когда они мигрируют через кровообращение и закрепляются в органах-мишенях [65]. Кроме того, некоторые инфильтрирующие иммунные клетки, такие как макрофаги, могут подвергать раковые клетки

воздействию активных форм кислорода, повреждающих ДНК, тем самым способствуя мутационным процессам.

Большинство типов солидных опухолей связаны с опухоль-стимулирующей иммунной инфильтрацией, которая варьируется от гистологически малозаметных до очевидных воспалительных реакций, распознаваемых патологоанатомами. Кроме того, давно признанная эпидемиологическая связь между хроническим воспалением и канцерогенезом поддерживает предположение о том, что ранее существовавшие воспалительные состояния могут быть благодатной почвой для возникновения и прогрессирования определенных форм рака.

Нестабильность генома как активирующий фактор

Клеточный геном подвергается обычным повреждениям ДНК из-за множества химически реактивных продуктов нормального метаболизма, из-за воздействия окружающей среды и из-за репликации ДНК во время каждого клеточного деления. Возникающие в результате дефекты, если их не исправить, становятся наследуемыми клетками мутациями, что объясняет потребность в сложном консорциуме белков, которые постоянно следят за целостностью ДНК и проводят репарацию в ответ на повреждение. Непоправимое повреждение провоцирует элиминацию клеток. Эту роль, как мы уже ранее отмечали, выполняет супрессор p53 [66].

Многие типы опухолей содержат неопластические клетки, которые несут легко идентифицируемые дефекты в сложном механизме, предназначенном для мониторинга и восстановления геномных повреждений. Наиболее очевидными являются часто документированные мутантные аллели p53. Без работающего p53 поврежденная ДНК может остаться невосстановленной, а мутантные клетки могут выжить и передать свои поврежденные геномы своему потомству. Многие другие специализированные ферменты репарации ДНК и поддержания генома также оказываются дефектными в опухолях, а наследственные семейные дефекты репарации ДНК часто приводят к повышенному риску развития рака (например, BRCA ассоциированные) [67].

Повышенная скорость и постоянство пролиферации в опухолях создают клеточные линии, которые претерпели гораздо больше последовательных циклов роста и деления, чем это типично для клеток в нормальных тканях, что еще больше увеличивает вероятность генетических ошибок, возникающих во время репликации ДНК. Среди этих последствий есть критически укороченные и, следовательно, дисфункциональные теломеры, которые могут запускать хромосомные перестройки и слияния, по-разному влияющие на функцию генов. Мутантные раковые клетки, выжившие в этом кариотипическом хаосе, возможно, приобретают более выгодные фенотипы и, таким образом, способность подвергаться клональной экспансии.

На сегодняшний день анализ Ханахана и Вайнберга остается ведущим обзором того, почему клетка является злокачественной. Отметим, что в дополнение к уже признанным отличительным признакам рака Ханахан в 2022 году предположил, что раскрытие фенотипической пластичности, немутационное эпигенетическое перепрограммирование, полиморфные микробиомы также могут быть новыми отличительными особенностями рака, а стареющие клетки – активирующим фактором [68]. Модель Ханахана и Вайнберга в целом основана на генетической теории рака – идее о том, что рак – это заболевание,

вызванное накоплением мутаций, эпигенетических изменений и генетических изменений в ключевых генах, которые регулируют репликацию клеток, клеточное деление, клеточный метаболизм и клеточный рост. Это доминирующая в настоящее время теория. Однако есть достаточно убедительные доказательства того, что рак – это метаболическое заболевание. Рассмотрим подробнее обе гипотезы.

Рак как генетическое заболевание

С начала XIX века известно, что рак может передаваться по наследству [69]. Однако только в конце 40-х и начале 50-х годов XX века с помощью анализа реестров близнецов и больших семейных когорт была установлена четкая генетическая или наследственная связь отдельных раков [70, 71]. Наследственные опухолевые синдромы – это заболевания, возникающие в результате специфической онкогенной мутации, передаваемой от одного поколения к другому. Известно более 50 наследственных форм рака, включая синдром Линча, семейный аденоматозный полипоз, наследственный рак молочной железы и яичников и анемию Фанкони. Существование наследственных форм рака является самым убедительным доказательством роли генетики и генетических мутаций в развитии этого заболевания. Кроме того, многие из выявленных при наследственных формах рака мутированные гены идентичны выявленным при спорадических опухолях. К ним относятся мутации в генах-супрессорах опухолей, таких как TP53, BRCA1 и BRCA2, а также генах репарации неспаренных оснований, таких как MLH1 и MSH2, и генах, связанных с метаболизмом, таких как SDH (сукцинатдегидрогеназа). Общая генетика наследственных и спорадических раковых заболеваний помогла пролить свет на ключевую роль, которую играют определенные типы соматических мутаций в спорадических раках [72]. Вместе с тем группа наследственных раков невелика и составляет не более 10% всех солидных опухолей.

Большинство спорадических злокачественных клеток имеют мутации. Эти мутации не являются врожденными или наследуемыми, а скорее приобретенными. Ключевым вопросом, на который генетика не дает ответа, является то, как приобретаются эти соматические мутации. Согласно ТСМ, приобретенные мутации возникают в результате внешних факторов (мутагенов) или воздействия окружающей среды, приводящих к генетической нестабильности [73]. Эти инициаторы рака, возможно, более важны, чем сами генетические повреждения.

При секвенировании генома злокачественной опухоли (спорадической или наследственной), как правило, выявляется большое число мутаций (100 и более, из которых 10-12 являются так называемыми драйверными мутациями, а остальные – «пассажирскими» мутациями) [6, 74]. Драйверные мутации способствуют канцерогенезу или управляют им, в то время как мутации-пассажиры являются просто случайными, возникающими из-за нестабильности генома. Различные виды рака, как правило, демонстрируют разное количество драйверных генов: у некоторых, таких как определенные типы рака почек, их всего два, а у других, например, рак эндометрия, их более 50 [74].

На сегодняшний день идентифицировано около 300 драйверных генов среди почти 600 известных опухоль-ассоциированных генов человека [75]. Важно отметить, что возможность идентифицировать специфические драйверные гены в опухолях легла в основу прецизионного подхода в онкологии с использованием таргетных препаратов, ингибирующих основные сигнальные пути в конкретной опухоли [74].

Большинство опухоль-ассоциированных генов или драйверных генов рака можно разделить на две большие группы: гены-супрессоры опухолей и онкогены или протоонкогены. Гены-супрессоры подавляют пролиферацию клеток и развитие опухоли, другими словами, они являются антионкогенами. Если ген-супрессор опухоли мутирован, поврежден или изменен эпигенетически, это может привести к пролиферации клеток и онкогенезу. Супрессоры опухоли можно разделить на шесть основных категорий:

- гены, контролирующие клеточный цикл, или ингибиторы клеточного деления;
- гены, кодирующие рецепторы гормонов или факторов роста;
- гены, ответственные за регуляцию контрольных точек;
- индукторы апоптоза;
- гены клеточной адгезии;
- гены репарации ДНК.

В отличие от генов-супрессоров опухолей, онкогены действуют как драйверы канцерогенеза. В частности, онкогены представляют собой мутированные гены, которые способствуют развитию рака. Немутированные онкогены называются протоонкогенами.

Онкогены можно разделить на пять категорий:

- гены, кодирующие факторы роста;
- рецепторы факторов роста,
- преобразователи сигналов,
- факторы транскрипции;
- регуляторы запрограммированной гибели клеток [76].

Гены-супрессоры и онкогены играют роль только в 6 отличительных признаках рака, таких как нестабильность генома, устойчивость пролиферативных сигналов, уклонение от супрессоров роста, сопротивление клеточной гибели, обеспечение репликативного бессмертия, активация инвазии и метастазирования. При этом онкогены и опухолевые супрессоры, вероятно, играют малую или не играют никакой роли в четырех других признаках рака: индукции ангиогенеза; нарушении регуляции клеточного метаболизма; уклонении от иммунного разрушения; воспалении, способствующем развитию опухоли [8, 76]. Данный факт свидетельствует в пользу того, что другие, негенетические факторы также могут играть роль в инициировании и поддержании роста опухоли [10, 15].

Последовательные мутационные события, управляющие развитием рака, в большей степени поддерживаются в одних типах рака, чем в других. Рак у детей обычно лишен мутаций, характерных для опухолей взрослых [6]. В то время как некоторые мутации являются общими для нескольких видов рака, другие кажутся исключительными для определенных типов рака. Эти противоречия в ТСМ, возможно, удастся разрешить.

При раке толстой кишки тщательно изучали последовательные мутационные события, характеризующие его развитие. Это было продемонстрировано экспериментально с использованием последовательного CRISPR/Cas нокаута генов аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), белка p53 (TP53), вируса саркомы крыс Кирстен (KRAS) и члена семейства SMAD 4 (SMAD4) в стволовых клетках кишечника, которые приобретали опухолевый фенотип и развивались в инвазивную карциному у мышей [77]. Подобные исследования дают убедительные доказательства того, что генетические изменения в генах являются ключевыми факторами развития рака. Однако, в отличие от рака толстой кишки, такие последовательные генетические события в генах, приводящие к злокачественной трансформации, не могут быть показаны для других типов рака. Исследования, стремящиеся охарактеризовать мутационные события при раке, обычно выделяют постоянное увеличение мутационной нагрузки опухолей, по мере того как они прогрессируют, но обычно не идентифицируют гены, которые несут исключительную ответственность за каждый этап прогрессирования опухоли. Совершенно непонятно, как клетки с сотнями мутаций и геномных перестроек выживают и получают преимущество перед здоровыми нормальными клетками. При всем нашем понимании генетики эта концепция кажется противоречащей ожидаемому, поскольку накопление мутаций должно наносить «ущерб» раковым клеткам, делать их иммуногенными и метаболически уязвимыми. Если только возникающие мутации не являются результатом основного дефекта [3].

Убедительным доказательством того, что рак является генетическим заболеванием, является наличие мутаций в геноме раковых клеток, которые не встречаются в близлежащих нормальных тканях. Однако, несмотря на то что признаки рака являются общими для всех видов рака, ни одна генная мутация не связана со всеми видами рака. Ген, кодирующий белок p53 – TP53, обычно мутирует при большинстве видов рака. При некоторых опухолях (например, яичников, пищевода, толстой кишки, головы и шеи, гортани и легких) частота мутаций p53 составляет около 38–50%. Частота мутаций p53 еще ниже при других видах рака (например, при лейкозе, саркоме, раке яичка, меланоме и раке шейки матки), ~ 5% [78, 79]. Это показывает, что ни одна мутация одного гена не характерна для всех видов рака. Генетическая теория постулирует, что изменения в различных наборах генов в конечном итоге приводят к фенотипическим изменениям клеток, характерным для рака. Это объяснение не полностью подтверждается нынешним пониманием большинства генетических нарушений, когда мутации в очень разных наборах генов приводят к одному и тому же фенотипическому результату. Кроме того, поскольку широко распространено мнение, что клеткам обычно требуется две или более драйверных мутаций в генах, связанных с раком, чтобы стать канцерогенными [80], и поскольку эти гены обычно выполняют по одной функции каждый, это означает, что зарождающиеся опухоли могут проявлять только два из десяти известных признаков рака. Кроме того, некоторые типы опухолей демонстрируют очень большое число (> 40) драйверных мутаций, что вызывает вопрос: «Как может быть приобретено так много независимых драйверных мутаций в одной ткани?». Опять же, это говорит о том, что другие, негенетические факторы должны играть роль как в инициировании, так и в поддержании роста опухоли [10,

15]. Могут ли мутации, выявляемые при раке, быть следствием, а не причиной опухоли? Если эта теория верна, то необходимо найти исходные провоцирующие события и направить терапию на их предупреждение. Эта концепция не является искусственной, так как есть исследования, которые подробно описывают функции обычно идентифицируемых генов-супрессоров и онкогенов и их связь с ключевыми ролями в клеточном метаболизме. Активация онкогенов и потеря опухолевых супрессоров способствуют метаболическому перепрограммированию при раке, что приводит к повышенному поглощению питательных веществ для снабжения энергетических и биосинтетических путей. Однако ограничения питательных веществ в солидных опухолях могут потребовать, чтобы злокачественные клетки проявляли метаболическую гибкость для поддержания роста и выживания [81]. Неограниченные мутации в ассоциированных с раком генах затрагивают три основных метаболических пути: аэробный гликолитический путь, катаболический путь глутамина и одноуглеродный метаболизм. Эти генетические изменения, в конечном счете, создают измененное метаболическое состояние, позволяющее раковым клеткам генерировать большое количество макромолекул (аминокислот, нуклеотидов и жирных кислот) и метаболических промежуточных продуктов, необходимых для быстрого роста и деления клеток [82]. Таким образом, может ли рак быть по существу метаболическим заболеванием?

Рак как метаболическое заболевание

В 1920-х годах Отто Варбург обратил внимание на то, что опухоли поглощают огромное количество глюкозы по сравнению с нормальными тканями. Кроме того, глюкоза ферментируется с образованием лактата даже в присутствии кислорода – происходит аэробный гликолиз [43, 44]. Это явление получило название эффекта Варбурга. Наблюдения Варбурга привели к представлению о том, что рак является метаболическим заболеванием, и эта концепция широко поддерживалась до 1970-х годов, когда появились представление о генетической природе рака [83]. В последнее время идея рака как метаболического расстройства вновь обсуждается и привлекает большое внимание. Например, существует предположение, что рак возникает из-за дефектов производства энергии посредством окислительного фосфорилирования в митохондриях [84]. Окислительное фосфорилирование генерирует большую часть энергии, необходимой клеткам, следовательно, любой дефект в количестве, структуре и функции митохондрий изменит выработку энергии. Постепенно это дефектная продукция энергии приводит к замене недостаточного дыхания ферментацией для производства энергии, что приводит к активации путей, ведущих к неоплазии [4, 84]. Следовательно, эффект Варбурга является наиболее распространенным патологическим фенотипом рака. Недавние данные также указывают на то, что опухолевые клетки могут использовать фосфорилирование на уровне митохондриального субстрата в качестве еще одного пути ферментации для компенсации нарушения дыхания. Митохондриальное фосфорилирование на уровне субстрата предоставляет доказательства, ранее отсутствовавшие в теории Варбурга. Дефектное окислительное фосфорилирование с компенсаторной зависимостью от ферментации для получения энергии

производит активные формы кислорода, которые являются как мутагенными, так и канцерогенными. Таким образом, согласно метаболической теории рака, соматические мутации и все другие признаки рака являются нижестоящими эпифеноменами, происходящими от начальных нарушений клеточного энергетического обмена [4, 15, 84].

Совершенствование технологий секвенирования в сочетании с увеличением генетических данных и повышением доступности метаболомики привело к пониманию того, что многие онкогены и опухолевые супрессоры фактически служат метаболическими центрами [85-87]. Например, известно, что такие онкогены как PI3K/Akt и BCR-ABL усиливают поглощение глюкозы и повышают активность гексокиназы II [87]. Точно так же активация онкогенов c-Myc, Ras и Her2/Neu приводит к усилению гликолиза [87, 88]. Напротив, опухолевой супрессор p53 способствует окислительному фосфорилированию, тогда как его потеря приводит к гликолизу. Точно так же опухолевые супрессоры сукцинатдегидрогеназа, фумаратгидратаза и изоцитратдегидрогеназа отвечают за поддержание цикла трикарбоновых кислот, а их потеря приводит к генетической нестабильности и эпигенетическим изменениям [87]. Связь между онкогенами и метаболизмом приводит к тому, что генетический взгляд на рак приблизился к метаболическому взгляду. Метаболомика также привела к трем другим важным достижениям: определению ключевых метаболических путей или метаболических типов, участвующих в развитии рака [87, 89], открытию онкометаболитов [90] и выяснению того, как связанные с раком метаболиты и опухолевый метаболизм объясняют многие отличительные признаки рака [91].

Почти все виды рака демонстрируют одну или несколько форм метаболической дисрегуляции. К ним относятся аэробный гликолиз, глутаминолиз, нарушение одноуглеродного метаболизма и/или измененный метаболизм незаменимых аминокислот [87, 89, 91]. Аэробный гликолиз, метаболический процесс, присутствующий во многих пролиферирующих клетках, характеризуется высоким уровнем потребления глюкозы, умеренной продукцией энергии, значительным образованием лактата и нуклеотидов и предшественников липидов, необходимых для биосинтеза клеток [92]. Гены, участвующие в гликолизе, гиперэкспрессированы в 70% известных видов рака, при этом лимфомы, рак предстательной железы, почки и головного мозга демонстрируют особенно высокий уровень экспрессии этих гликолитических генов [93, 94]. Аэробный гликолиз иногда называют «зависимостью от глюкозы», поскольку он подчеркивает критическую потребность в глюкозе для поддержания роста раковых клеток.

Глутаминолиз – еще один тип метаболического процесса, обнаруживаемый в активно пролиферирующих клетках. Он характеризуется необычно высоким уровнем поглощения глутамина. Глутамин является наиболее распространенной аминокислотой в крови и важным источником энергии для многих тканей. При глутаминолизе аминокислота глутамин расщепляется и превращается в промежуточные соединения трикарбоновых кислот и другие азотсодержащие предшественники, которые затем используются при синтезе нуклеиновых кислот, некоторых аминокислот и липидов. Глутаминолиз также необходим для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза за счет синтеза глутатиона, что делает раковые клетки более устойчивыми к активным формам кислорода [95]. Глутамин и глутаминолиз играют ключевую роль в передаче

сигналов роста раковых клеток (через путь mTOR), обеспечивая биомассу, энергию и антиоксиданты, чтобы помочь раковым клеткам непрерывно реплицироваться, избегая подавления роста за счет уменьшения аутофагии, ограничения гибели клеток и активации клеточной инвазии или метастазирования. Глутаминолиз обычно наблюдается при раке легких, молочной железы, мочевого пузыря и крови, а также при других видах рака, ассоциированных с c-Myc [88, 96].

В дополнение к аэробному гликолизу и глутаминолизу некоторые виды рака, особенно рак молочной железы и легких, лимфобластный лейкоз, нейробластома и меланома, имеют нарушение регуляции одноуглеродного метаболизма [97]. Одноуглеродный метаболизм включает использование метионина, глицина, серина, холина и фолиевой кислоты в качестве источников метильных групп, необходимых для синтеза ДНК, полиаминов, аминокислот, креатина и фосфолипидов. Эти метильные группы также необходимы для метилирования гистонов и ДНК. Следовательно, считается, что нарушение регуляции одноуглеродного метаболизма способствует эпигенетическим изменениям, часто наблюдаемым при раке. Менее оцененная форма метаболической дисрегуляции при раке заключается в использовании (или неправильном использовании) незаменимых аминокислот опухолевыми клетками. Незаменимые аминокислоты должны поступать с пищей, но если их недостаточно, организм может использовать эти аминокислоты из мышечной ткани [98, 99]. Этот метаболический синдром, который может развиваться как в результате роста опухоли, так и в результате вызванного опухолью воспаления, вызывает раковую кахексию. Синдром кахексии нередко наблюдается у онкологических больных на поздних стадиях заболевания [99, 100]. Незаменимые аминокислоты, особенно аминокислоты с разветвленной цепью, и продукты их распада (такие как кинуренин и полиамины) также используются в качестве сигнальных молекул для усиления анаболических процессов (посредством mTOR), вызывая воспаление, поддерживая иммуносупрессию или усиливая клеточную пролиферацию [101].

Еще одним аргументом в пользу метаболической природы рака стало открытие онкометаболитов – эндогенных клеточных метаболитов, которые накапливаются в опухолях, поддерживая ее рост и метастазирование [90, 91, 102]. Первым был 2-гидроксиглутарат, в высоких концентрациях обнаруженный в глиомах [90]. Этот метаболит функционально модифицирует паттерны метилирования гистонов, изменяет дифференциальную экспрессию генов и приводит к канцерогенезу [103–105]. К числу недавно охарактеризованных онкометаболитов относятся:

- фумарат при почечно-клеточном раке;
- саркозин при раке предстательной железы;
- глицин при раке молочной железы;
- аспарагин при лейкемии;
- холин при раке предстательной железы, головного мозга и молочной железы;
- лактат, глюкоза, глютамин и серин при нескольких видах рака [102, 106].

При этом онкометаболиты не только приводят к нестабильности генома или эпигенетическим изменениям. Например, 2-гидроксиглутарат также индуцирует ангиогенез [107], предотвращает апоптоз или некроптоз [108], приводит

к иммуносупрессии [109] и активирует сигналы к росту клеток через сигнальный путь mTOR [110]. Принимая во внимание более широкие роли, которые онкометаболиты (и другие эндогенные метаболиты) играют в канцерогенезе, и помня, что онкометаболиты – это просто метаболиты, которые инициируют или поддерживают рост опухоли, можно идентифицировать гораздо больше онкометаболитов, чем принято сегодня.

Многие из онкометаболитов являются известными биомаркерами рака. В частности, радиоактивные производные глюкозы и глутамина широко используются в визуализации опухолей с помощью позитронно-эмиссионной томографии [111]. Другие метаболиты являются более опухоль-специфичными и их уровни или соотношения изменены в крови (например, глицин, гистидин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, орнитин, фенилаланин пролин/гидроксипролин, треонин, триптофан, тирозин, валин, лактат, пируват 2/3-Гидроксибутират 3-Гидроксимасляная кислота и т. д.) или моче (например, гиппурат, креатин, тирозин, цитрат, изолейцин, фенилаланин, путресцин, сукцинат, триптофан, валин) [112-117]. В совокупности каждый из известных признаков рака может быть объяснен с помощью как минимум одного из известных онкометаболитов. Фактически всего три онкометаболита – лактат, глютамин и глюкоза – могут объяснить или участвовать в процессах, которые объясняют все признаки рака [118].

Таким образом, в настоящее время существуют убедительные доказательства значимой роли особенностей клеточного метаболизма в канцерогенезе. Безусловно, необходимы дальнейшие исследования в данной области, однако уже сейчас понятно, что нельзя не рассматривать рак как метаболическое расстройство, особенно при выборе терапевтических подходов.

Заключение

Описанные признаки рака представляют основу для понимания физиологии опухолевого процесса, открывают перспективу для исследования и интерпретации патогенетических механизмов и применения этих знаний для разработки более эффективных методов диагностики и лечения онкологических заболеваний. Вместе с тем в текущем понимании основных отличительных признаков рака лежит генетическое представление о его природе. В течение долгого времени теория о том, что рак является генетическим заболеванием, была движущим фактором исследования этой патологии. Однако, несмотря на явный прогресс в понимании многих внутри- и внеклеточных механизмов, достигнутый в том числе благодаря методике полногеномного секвенирования, эти знания не всегда позволяют объяснить многие процессы и не обеспечивают (что чрезвычайно важно) выявления высокоэффективных методов излечения рака.

Можно задать вопрос: почему генетическая теория рака является преобладающей теорией? Сегодня метаболическая теория рака быстро укореняется и вызывает большой интерес. Кажется достаточно очевидным, что генетическая теория усложняет наше понимание рака, в то время как метаболическая теория рака невероятно проста и открывает большие перспективы для диагностики и лечения. При этом даже если существующие генетические

и метаболические теории, основанные на наиболее фундаментальных и значимых свойствах опухолевых клеток, могут быть принципиально различны, нельзя говорить, что они исключают друг друга, но скорее являются взаимодополняющими.

Список литературы

1. Cancer: World Health Organization (WHO); 2021 [Available from: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer.
2. *Seyfried TN, Flores RE, Poff AMet al.* Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. Carcinogenesis. 2013; 35(3):515–27.
3. *Gyamfi J, Kim J, Choi J.* Cancer as a Metabolic Disorder. Int J Mol Sci. 2022; 23(3).
4. Seyfried TN. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. Front Cell Dev Biol. 2015; 3:43.
5. *Baker SG.* The detached pericyte hypothesis: A novel explanation for many puzzling aspects of tumorigenesis. Organisms Journal of Biological Sciences. 2018; 2(1):25–42.
6. *Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VEet al.* Cancer Genome Landscapes. Science. 2013; 339(6127):1546–58.
7. *Hanahan D, Weinberg RA*. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000; 100(1):57–70.
8. *Hanahan D, Weinberg Robert A.* Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011; 144(5):646–74.
9. *Baker SG.* The case for a cancer paradox initiative. Carcinogenesis. 2021; 42(8):1023–5.
10. *Soto AM, Sonnenschein C.* The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. BioEssays. 2011; 33(5):332–40.
11. *Davies PCW, Lineweaver CH.* Cancer tumors as Metazoa 1.0: tapping genes of ancient ancestors. Physical Biology. 2011; 8(1):015001.
12. *Lineweaver CH, Bussey KJ, Blackburn ACet al.* Cancer progression as a sequence of atavistic reversions. BioEssays. 2021; 43(7):2000305.
13. Sell S. On the Stem Cell Origin of Cancer. The American Journal of Pathology. 2010; 176(6):2584–94.
14. *Warburg O.* On the Origin of Cancer Cells. Science. 1956;123(3191):309–14.
15. Seyfried TN, Chinopoulos C. Can the Mitochondrial Metabolic Theory Explain Better the Origin and Management of Cancer than Can the Somatic Mutation Theory? Metabolites. 2021;11(9):572.
16. *Majérus M-A.* The cause of cancer: The unifying theory. Advances in Cancer Biology – Metastasis. 2022; 4:100034.
17. *Wee P, Wang Z.* Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. Cancers (Basel). 2017; 9(5).
18. *Gkolfinopoulos S, Mountzios G.* Beyond EGFR and ALK : targeting rare mutations in advanced non-small cell lung cancer. Annals of Translational Medicine. 2018; 6(8):142.
19. *Engeland K.* Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. Cell Death & Differentiation. 2022; 29(5):946–60.
20. *Zhu L, Lu Z, Zhao H.* Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. Oncogene. 2015; 34(35):4547–57.
21. *Elmore S.* Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4):495–516.
22. *Montico B, Nigro A, Casolaro Vet al.* Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development. Int J Mol Sci. 2018; 19(2).

23. *Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet Set al.* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014; 15(2):135–47.
24. *D'Arcy MS.* Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International. 2019; 43(6):582–92.
25. *Shay JW, Wright WE.* Telomeres and telomerase: three decades of progress. Nature Reviews Genetics. 2019; 20(5):299–309.
26. *Tutton S, Lieberman PM.* A role for p53 in telomere protection. Mol Cell Oncol. 2017; 4(6):e1143078.
27. *Bernal A, Tusell L.* Telomeres: Implications for Cancer Development. International Journal of Molecular Sciences. 2018; 19(1):294.
28. *Trybek T, Kowalik A, Góźdź Set al.* Telomeres and telomerase in oncogenesis (Review). Oncol Lett. 2020;20(2):1015–27.
29. *Dilley RL, Greenberg RA.* ALTernative Telomere Maintenance and Cancer. Trends Cancer. 2015;1(2):145–56.
30. *Al-Ostoot FH, Salah S, Khamees HAet al.* Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. Cancer Treatment and Research Communications. 2021; 28:100422.
31. *Ribatti D, Nico B, Crivellato Eet al.* The structure of the vascular network of tumors. Cancer Lett. 2007;248(1):18-23.
32. *Kahn BM, Lucas A, Alur RGet al.* The vascular landscape of human cancer. The Journal of Clinical Investigation. 2021; 131(2).
33. *Ribatti D, Pezzella F.* Overview on the Different Patterns of Tumor Vascularization. Cells. 2021; 10(3).
34. *Ribatti D, Pezzella F.* Vascular Co-Option and Other Alternative Modalities of Growth of Tumor Vasculature in Glioblastoma. Front Oncol. 2022;12.
35. *Donnem T, Hu J, Ferguson Met al.* Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? Cancer Med. 2013; 2(4):427–36.
36. *Mareel M, Leroy A*. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. Physiological Reviews. 2003; 83(2):337–76.
37. *Liu M, Yang J, Xu Bet al*. Tumor metastasis: Mechanistic insights and therapeutic interventions. MedComm. 2021;2(4):587–617.
38. *Roche J.* The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. Cancers (Basel). 2018; 10(2).
39. *Keith B, Johnson RS, Simon MC.* HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. Nat Rev Cancer. 2011;12(1):9–22.
40. *Semenza GL.* Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. Trends Pharmacol Sci. 2012; 33(4):207–14.
41. *Baccelli I, Trumpp A.* The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. J Cell Biol. 2012;198(3):281–93.
42. *Savagner P.* Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity. Curr Top Dev Biol. 2015;112:273–300.
43. *Warburg O.* The metabolism of carcinoma cells. The Journal of Cancer Research. 1925;9(1):148–63.
44. *Warburg OH.* Uber den stoffwechsel der tumoren. 1926.
45. *Vander Heiden MG,* Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009;324(5930):1029–33.
46. *Vaupel P, Multhoff G.* Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. The Journal of Physiology. 2021; 599(6):1745–57.
47. *Bose S, Zhang C, Le A.* Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. In: Le A, editor. The Heterogeneity of Cancer Metabolism. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 3–15.

48. *Daye D, Wellen KE.* Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. Semin Cell Dev Biol. 2012; 23(4):362–9.

49. *de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DOet al.* Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. Front Oncol. 2019;9.

50. *Dhup S, Dadhich RK, Porporato PEet al.* Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. Curr Pharm Des. 2012;18(10):1319–30.

51. *Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal Met al.* Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. Semin Oncol. 2017; 44(3):198–203.

52. *Ward PS, Thompson CB.* Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. Cancer Cell. 2012; 21(3):297–308.

53. *Vinay DS, Ryan EP, Pawelec Get al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Seminars in Cancer Biology. 2015; 35:S185–S98.

54. *Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH.* Systemic immunity in cancer. Nature Reviews Cancer. 2021; 21(6):345–59.

55. *Vitiello GAF, Ferreira WAS, Cordeiro de Lima VCet al.* Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment. Frontiers in Immunology. 2021;12.

56. *Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Jr.et al.* Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. Jama. 2011; 306(17):1891–901.

57. *Yarchoan R, Uldrick TS.* HIV-Associated Cancers and Related Diseases. New England Journal of Medicine. 2018;378(11):1029–41.

58. *Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman Cet al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nature Reviews Cancer. 2012;12(4):298–306.

59. *Galon J, Mlecnik B, Bindea Get al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol. 2014; 232(2):199–209.

60. *Galon J, Angell HK, Bedognetti Det al.* The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. Immunity. 2013; 39(1):11–26.

61. *Greten FR, Grivennikov SI.* Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. Immunity. 2019; 51(1):27–41.

62. *Coussens LM, Werb Z.* Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420(6917):860–7.

63. *Lindau D, Gielen P, Kroesen Met al.* The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. Immunology. 2013;138(2):105–15.

64. *Haist M, Stege H, Grabbe Set al.* The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. Cancers. 2021;13(2):210.

65. *Labelle M, Hynes RO.* The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. Cancer Discov. 2012; 2(12):1091–9.

66. *Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD.* Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11(3):220–8.

67. *Pikor L, Thu K, Vucic Eet al.* The detection and implication of genome instability in cancer. Cancer and Metastasis Reviews. 2013; 32(3):341–52.

68. *Hanahan D.* Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery. 2022;12(1):31–46.

69. *Hajdu SI.* Thoughts about the cause of cancer. Cancer. 2006;106(8):1643–9.

70. *Busk T, Clemmesen J, Nielsen A.* Twin studies and other genetical investigations in the Danish Cancer Registry. Br J Cancer. 1948; 2(2):156–63.

71. *Durham H.* Familial cancer of the colon. Western journal of surgery, obstetrics, and gynecology. 1954; 62(1):26–31.
72. *Nagy R, Sweet K, Eng C.* Highly penetrant hereditary cancer syndromes. Oncogene. 2004; 23(38):6445–70.
73. *Comings DE.* A General Theory of Carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1973; 70(12):3324–8.
74. *Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo Eet al.* Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell. 2018;173(2):371–85.e18.
75. *Tate JG, Bamford S, Jubb HCet al.* COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Nucleic Acids Research. 2018; 47(D1):D941–D7.
76. *Brown G.* Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. Int J Mol Sci. 2021;22(18).
77. *Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen Bet al.* Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. Nature. 2015;521(7550):43–7.
78. *Olivier M, Hollstein M, Hainaut P.* TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2010; 2(1).
79. *Wang X, Sun Q.* TP53 mutations, expression and interaction networks in human cancers. Oncotarget. 2017; 8(1):624–43.
80. *Knudson AG.* Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1971; 68(4):820–3.
81. *Boroughs LK, DeBerardinis RJ.* Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. Nat Cell Biol. 2015; 17(4):351–9.
82. *Li C, Zhang G, Zhao Let al.* Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. World Journal of Surgical Oncology. 2016;14(1):15.
83. *Liberti MV, Locasale JW.* The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends in Biochemical Sciences. 2016; 41(3):211–8.
84. *Seyfried TN, Shelton LM.* Cancer as a metabolic disease. Nutrition & Metabolism. 2010; 7(1):7.
85. *Thompson CB.* Metabolic Enzymes as Oncogenes or Tumor Suppressors. New England Journal of Medicine. 2009; 360(8):813–5.
86. *Wishart DS.* Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. Nature Reviews Drug Discovery. 2016;15(7):473–84.
87. *Pavlova Natalya N, Thompson Craig B.* The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metabolism. 2016; 23(1):27–47.
88. *Dong Y, Tu R, Liu Het al.* Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. Signal Transduct Target Ther. 2020; 5(1):124.
89. *Wishart DS.* Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? EBioMedicine. 2015; 2(6):478–9.
90. *Dang L, White DW, Gross Set al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature. 2009; 462(7274):739–44.
91. *Wishart DS.* Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. Physiological reviews. 2019; 99(4):1819–75.
92. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. 2011.
93. *Altenberg Ba, Greulich K.* Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. Genomics. 2004; 84(6):1014–20.
94. *Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R.* Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. Expert review of anticancer therapy. 2013;13(6):711–9.
95. *Jin L, Alesi G, Kang S.* Glutaminolysis as a target for cancer therapy. Oncogene. 2016; 35(28):3619–25.

96. *Goetzman ES, Prochownik EV.* The role for Myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. Frontiers in endocrinology. 2018; 9:129.

97. *Li AM, Ye J.* Reprogramming of serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. 2020;1866(10):165841.

98. *Porporato P.* Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. Oncogenesis. 2016; 5(2):e200-e.

99. *Argiles J, Costelli P, Carbo Net al.* Branched-chain amino acid catabolism and cancer cachexia. Oncology Reports. 1996; 3(4):687–90.

100. *Aoyagi T, Terracina KP, Raza Aet al.* Cancer cachexia, mechanism and treatment. World journal of gastrointestinal oncology. 2015; 7(4):17.

101. *Lieu EL, Nguyen T, Rhyne Set al.* Amino acids in cancer. Experimental & molecular medicine. 2020; 52(1):15–30.

102. *Yang M, Soga T, Pollard PJ.* Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. The Journal of Clinical Investigation. 2013;123(9):3652–8.

103. *Ward PS, Cross JR, Lu Cet al.* Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(−)-2-hydroxyglutarate production. Oncogene. 2012; 31(19):2491–8.

104. *Gross S, Cairns RA, Minden MDet al.* Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. Journal of Experimental Medicine. 2010; 207(2):339–44.

105. *Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-Met al.* The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. EMBO reports. 2011;12(5):463–9.

106. *Yang M, Soga T, Pollard Pet al.* The emerging role of fumarate as an oncometabolite. Front Oncol. 2012;2.

107. *Seok J, Yoon SH, Lee SHet al.* The oncometabolite d-2-hydroxyglutarate induces angiogenic activity through the vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling pathway. International Journal of Oncology. 2019;54(2):753–63.

108. *Yang Z, Jiang B, Wang Yet al.* 2-HG inhibits necroptosis by stimulating DNMT1-dependent hypermethylation of the RIP3 promoter. Cell reports. 2017;19(9):1846–57.

109. *Richardson LG, Choi BD, Curry WT.* (R)-2-hydroxyglutarate drives immune quiescence in the tumor microenvironment of IDH-mutant gliomas. Translational cancer research. 2019; 8(Suppl 2):S167.

110. *Carbonneau M, M Gagné L, Lalonde M-Eet al.* The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. Nature communications. 2016; 7(1):1–12.

111. *Croteau E, Renaud JM, Richard MAet al.* PET Metabolic Biomarkers for Cancer: Supplementary Issue: Biomarkers and their Essential Role in the Development of Personalised Therapies (A). Biomarkers in cancer. 2016; 8:BIC. S27483.

112. *Bamji-Stocke S, van Berkel V, Miller DMet al.* A review of metabolism-associated biomarkers in lung cancer diagnosis and treatment. Metabolomics. 2018;14(6):1–16.

113. *Erben V, Bhardwaj M, Schrotz-King Pet al.* Metabolomics biomarkers for detection of colorectal neoplasms: a systematic review. Cancers. 2018;10(8):246.

114. *Dinges SS, Hohm A, Vandergrift LAet al.* Cancer metabolomic markers in urine: Evidence, techniques and recommendations. Nature Reviews Urology. 2019;16(6):339–62.

115. *Simińska E, Koba M.* Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for early diagnosis of cancer. Amino Acids. 2016; 48(6):1339–45.

116. *Lee SH, Mahendran R, Tham SMet al.* Tryptophan–kynurenine ratio as a biomarker of bladder cancer. BJU international. 2021;127(4):445–53.

117. *Wang W, Tian SL, Jin Det al.* The role of bile acid subtypes in the diagnosis of cholangiocarcinoma. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology. 2022;18(2):e163-e72.

118. *Wishart D.* Metabolomics and the Multi-Omics View of Cancer. Metabolites. 2022;12(2):154.

Научное издание

Российская академия наук
Отделение физиологических наук
Секция клинической физиологии

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

Издается по решению Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН) от 31.03.2023 г.
и распространяется бесплатно

Верстка – Г.В. Власова
Обложка – Ю.В.Наточин

Издатель – Российская академия наук

Подписано в печать 14.11.2023
Формат 70x100/16. Объем 28,25 п. л. Гарнитура Times New Roman.
Печать офсетная. Бумага офсетная.
Тираж 300 экз. Заказ 23-08760

Отпечатано в типографии ООО «КОНСТАНТА»
308519, Белгородская обл., Белгородский р-н, пос. Северный, ул. Березовая, 1/12.
Тел./факс (4722) 300-720, www.konstanta-print.ru