

КОНСПЕКТ ВРАЧА

ВЫПУСК № 10 (1690)

Цистиноз был впервые описан более 100 лет назад швейцарским биохимиком Emil Abderhalden, обнаружившим при аутопсии младенца отложение кристаллов цистина в печени и селезёнке. В 20-30-е годы прошлого века был опубликован ряд клинических наблюдений за детьми, страдавшими от сочетания проявлений рахита, задержки физического развития, глюкозурии и фосфатурии. У этих пациентов была выявлена тотальная проксимальная канальцевая дисфункция, названная синдромом де Тони – Дебре – Фанкони. Чаше, однако, применяется синонимичное название – ренальный синдром Фанкони.

В последующем на протяжении многих лет оставался неясным вопрос о том, являются ли цистиноз и ренальный синдром Фанкони двумя разными заболеваниями или эти состояния представляют клинические варианты одной болезни. В 60-е годы с помощью электронной микроскопии и биохимических методов у значительной части детей с проксимальной канальцевой дисфункцией было обнаружено отложение кристаллов цистина и выраженное повышение его содержания внутри клеточных лизосом при нормальной его концентрации в крови. Стало понятно, что цистиноз является наиболее частой, хотя и не единственной причиной ренального синдрома Фанкони в раннем детском возрасте. Огромный шаг вперёд был сделан в 1998 г., когда был клонирован ген CTNS. Благодаря быстрым успехам молекулярной биологии был выявлен и новый белок цистинозин – лизосомальный переносчик цистина. Было установлено, что дисфункция этого протеина, обусловленная биаллельной мутацией гена CTNS, и приводит к данному заболеванию, сутью которого является нарушение трансмембранного транспорта цистина из лизосомы в цитозоль и накопление этой аминокислоты внутри клеточных лизосом.

Первоначально предполагалось, что при цистинозе повреждаются только почки. Однако с развитием заместительной почечной терапии и продлением жизни больных с терминальной почечной недостаточностью стало очевидно, что с течением времени в патологический процесс вовлекаются многие органы и заболевание становится мультисистемным. Наряду с поражением почек у больных развивается патология глаз, щитовидной железы, гонад, эндокринной функции поджелудочной железы, повреждение печени и селезёнки, периферических мышц и центральной нервной системы.

В настоящее время нет никакого сомнения в том, что назначение терапии цистеамином сразу же после верификации диагноза и продолжение этого лечения в течение всей последующей жизни является эффективной мерой, позволяющей уменьшить содержание цистина в лизосомах, отдалить и предотвратить многие осложнения болезни. Важным моментом лечения детей с цистинозом является симптоматическая терапия, направленная на компенсацию ренальных потерь воды и электролитов, дисфункции щитовидной железы, нарушения роста и т.д.

Нарушение транспорта цистина

В 1967 г. Schneider et al. впервые обнаружил увеличение уровня интрацеллюлярного цистина в гранулоцитах, а в 1968 г. Patrick et al., изучая электронную микроскопию лимфатических узлов пациентов с цистинозом, предположили, что накопление цистина возникает внутри лизосом. Goldman и Reeves в 1978 г. разработали метод, позволяющий искусственно насыщать аминокислотами изолированные лизосомы, используя диметилэфир этих аминокислот. В последующие годы ряд исследователей адаптировали этот метод для воспроизведения в эксперименте внутрилизосомального накопления цистина, сопоставимого количественно с уровнем, определяемым у больных цистинозом. Используя диметилэфир цистина (ДЭЦ), удавалось насыщать меченым цистином лизосомы, выделенные из цистинозных лейкоцитов

и фибробластов, что позволило изучать кинетику цистина. Было доказано, что причиной его накопления является дефект его выведения из лизосом в цитоплазму.

После этих исследований несколько веществ было протестировано на способность снижать уровень внутриклеточного цистина. Такими свойствами в небольшой степени обладали 1,4-дифторотриетол и аскорбиновая кислота, но настоящий прорыв был достигнут при использовании аминокислоты цистеина, который остаётся и сегодня главным лекарством для лечения цистиноза. Цистеин легко проникает в лизосомы и вступает в реакцию дисульфид-

Цистиноз: современные достижения в изучении механизмов болезни

ного обмена с цистином (цистин является дисульфидом цистеина), в результате которой эквивалентно образуются молекула нового дисульфидного соединения цистеин-цистеина и молекула цистеина. Эти вещества свободно покидают лизосому через систему катионных транспортёров, избегая дефектный цистинозный путь. Эффективность цистеина может контролироваться в клинической практике путём мониторинга уровня внутриклеточного цистина в полиморфноядерных лейкоцитах. Было предложено несколько способов определения уровня внутриклеточного цистина для диагностики цистиноза и мониторинга терапии цистеамином. Жидкостная хроматография с последующей тандемной масс-спектрометрией является наиболее широко применяемым методом. К сожалению, синдром Фанкони не выделяется цистеамином. Эта недостаточная эффективность цистеина не может быть объяснена дефектом проксимальной реабсорбции лекарства, так как препарат в очень небольшом количестве выделяется с мочой больных цистинозом. В нескольких работах изучался путь попадания цистина в цистинозные лизосомы. Экспериментальные данные с использованием меченого цистина в культуре цистинозных фибробластов продемонстрировали, что часть лизосомального цистина происходит из экстрацеллюлярного цистина, который поглощается лизосомой. Протеолитические процессы внутри самой лизосомы также дают значительную аккумуляцию цистина, что было продемонстрировано инкубацией цистинозных фибробластов в культуральной среде, содержащей бычий сывороточный альбумин (БСА). Накопление цистина после инкубации с БСА может быть ингибировано с помощью лизосомотропного препарата хлорохина, что позволило, меняя условия эксперимента, доказать связь между протеолизом альбумина в лизосоме и аккумуляцией цистина. До сих пор остаётся неясным, в какой степени накопление цистина в клетках проксимальных канальцев обусловлено гидролизом реабсорбированных белков, а в какой степени апикальной реабсорбцией цистина. Интересное исследование выполнили Jonas et al. Эти авторы показали, что выход цистина из лизосом зависит от активности протоновой АТФазы. Выход цистина из лизосом, заполненных ДЭЦ, стимулировался гидролизом экзогенной АТФ, и этот эффект отсутствовал в цистинозных лизосомах. Стимуляция активности протоновой АТФазы приводила к ацидофикации лизосом как в контроле, так и при цистинозе и коррелировало с выходом цистина только из нормальных лизосом. Это исследование показало существование кооперации между двумя транспортными системами у здоровых людей.

В цитозоле большая часть цистина легко превращается в свободный цистеин с помощью клеточных окислительно-восстано-

вительных систем, главной из которых является глутатионовая редокс-пара. В клетках проксимальных канальцев цистеин цитозоля является субстратом для нескольких транспортёров апикальной и базолатеральной мембран и может образовываться de novo из метионина. Значительная часть внутриклеточного цистеина через γ -глутамиловый цикл способствует синтезу глутатиона. Интересно, что содержание 5-оксопролина, одного из промежуточных метаболитов этого цикла, увеличивается в моче цистинозных больных, не принимающих цистеамин.

Молекулярные аспекты

Вскоре после начального описания цистиноза стало понятно, что наследование заболевания происходит по аутосомно-рецессивному типу. Анализ сцепления позволил локализовать область на хромосоме 17p, находящуюся между маркерами D17S1583 и D17S796. В 1998 г. ген CTNS был локализован в области 17p13.2 и успешно клонирован. В последующие

годы молекулярная диагностика позволила идентифицировать более 90 различных мутаций у пациентов с цистинозом. Ген CTNS состоит из 12 экзонов, из которых два первых представляют не кодирующие области. Этот ген имеет протяжённость 23 kb и кодирует белок цистинозин, состоящий из 367 аминокислот. Наиболее частой мутацией, обнаруживаемой в Северной Европе приблизительно в 75% повреждённых аллелей, является делеция 57 kb, удаляющая первые 9 и часть 10-го экзона гена CTNS, верхнюю 5' область соседнего гена CARKL и первые 2 не кодирующих экзона гена TRPV1. Функцией гена CARKL является фосфорилирование седогептулозы, промежуточного метаболита пентозно-фосфатного цикла. Соответственно пациенты с гомозиготной делецией 57 kb имеют повышение уровня седогептулозы в крови и моче, что может быть использовано для быстрого скрининга заболевания в семьях с этой мутацией. Фосфорилирование седогептулозы связано с пентозо-фосфатным циклом, поэтому данный дефект может вызывать нарушение внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов.

Так как пентозо-фосфатный цикл отвечает за образование НАДФ, можно предположить, что дефект CARKL может влиять на уровень этого вещества и нарушать внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы. Ген TRPV1 кодирует ионный канал, который первично экспрессируется в чувствительных нервах и активируется различными химическими стимулами, такими как капсаицин и активные ингредиенты перца чили. Продукт транскрипции TRPV1 участвует в различных биологических процессах, включая регуляцию сердечного ритма, механическую и термальную гипералгезию и психическое беспокойство. Значение повреждения генов CARKL и TRPV1 в патогенезе цистиноза у больных с гомозиготной 57 kb делецией в настоящее время ещё не полностью изучено, хотя можно предположить, что эти пациенты имеют более тяжёлые экстра-ренальные проявления и более высокую смертность.

Кроме делеции 57 kb, были описаны более мелкие делеции, инсерции, нонсенс-мутации, миссенс-мутации, мутации промоторных и сплайсинговых областей. Недавно Taranta et al. идентифицировали интронные мутации в двух разных семьях в одной или обеих CTNS-аллелях, нарушающие сплайсинг 5 и 9 экзонов. Эти результаты демонстрируют то обстоятельство, что цистиноз является моногенным заболеванием и сиквенс комплементарной ДНК должен выполняться в тех случаях, когда мутация не выявляется при сиквенсе гена. Изучение in vitro остаточной активности по транспорту цистина показало, что нефропатический цистиноз обычно является результатом тяжёлых мутаций с полной потерей данной функции. При этом

у больных интрализосомальный уровень цистина возрастает в 100 раз по сравнению со здоровыми людьми, в то время как у гетерозиготных носителей выявляется только незначительное возрастание этого уровня без развития клинических симптомов. Эти наблюдения доказывают, что экспрессия одного нормального аллеля является достаточной для предотвращения значительной аккумуляции цистина.

Экспериментальные модели

Хотя основные механизмы лизосомального накопления цистина при цистинозе разгаданы, патогенез заболевания окончательно не выяснен. Для изучения тонких механизмов, приводящих к дисфункции клеток, были разработаны несколько исследовательских моделей.

Модель на животных. Так как цистиноз является системным заболеванием, были разработаны модели болезни на животных для изучения патологии различных органов. Насыщение цистином лизосом

взрослых крыс с помощью ДЭЦ используется для воспроизведения в эксперименте цистинозного фенотипа. Парентеральное введение 400 мкмоль ДЭЦ дважды в день вызывает развитие признаков синдрома Фанкони, таких как полиурия, фосфатурия, глюкозурия и аминокислотурия. Причём в последующие 4 дня клиренс креатинина и уровень ренального интрацеллюлярного цистина значительно не изменяются, в отличие от увеличения уровня цистеина. Поэтому возникает вопрос о том, приводит ли в этой модели именно накопление цистина к развитию синдрома Фанкони или ДЭЦ обладает специфическим токсическим эффектом, который не имеет отношения к патогенезу цистиноза.

Первая модель *ctns*^{-/-} нокаут мышей была получена при скрещивании штаммов 129Sv и C57BL/6 с замещением последних 4 экзонов *ctns*. Было описано, что эта мутация приводит к полному прекращению цистинозинзависимого транспорта цистина. И хотя накопление цистина вызывает патологию зрения, мышц, костей и нервной системы у 129Sv X C57BL/6 *ctns*^{-/-} мышей, у них не возникает проксимальной канальцевой дисфункции и почечной недостаточности. Интересно, что в дальнейшем, после воспроизводства 10 поколений штамма C57BL/6, у *ctns*^{-/-} нокаут мышей в возрасте 15 месяцев развиваются неполная тубулопатия и почечная недостаточность. Этого не происходит при скрещивании их с FVB/N мышами. Эти результаты доказывают тот факт, что ренальный фенотип определяется генетическим базисом у мышей и позволяет высказать гипотезу о возможном влиянии модифицирующих генов на фенотип у человека. С другой стороны, поражение глаз у этих мышей почти идентично тому, что наблюдается у людей с цистинозом.

Hippert et al. пытались добиться обратного развития цистинозного фенотипа переносом здорового гена в больные клетки. Для этого путём трансдукции с использованием аденовирусного вектора в печень *ctns*^{-/-} мыши был введён «дикий тип» человеческого гена CTNS. В результате было показано, что перенос гена может восстановить, по крайней мере частично, лизосомальный транспорт цистина у молодых мышей (в возрасте 2-3 месяцев), но не оказывает эффекта у более старых мышей (в возрасте 5-9 месяцев), несмотря на эквивалентную эффективность трансдукции 20-75%. Очень обещающие данные были недавно получены у C57BL/6 *ctns*^{-/-} нокаут мышей после трансплантации им сингенетических клеток костного мозга, взятых у мышей в возрасте 2-4 месяцев, относящихся к штамму «дикого типа». После такой трансплантации уровень внутриклеточного цистина понизился более чем наполовину во всех исследуемых органах, включая почки, мозг и печень. Более того, было предотвращено прогрессирование почечной недостаточности и заметно

уменьшились кристаллы в роговице. Эти результаты трудно объяснить, учитывая количество пересаженных клеток (менее 15%), и требуются дальнейшие исследования для понимания этого феномена. Тем не менее данные этого эксперимента открывают новые перспективы для будущего лечения цистиноза.

Модель in vitro. Большинство современных знаний о патогенезе цистиноза было получено на модели in vitro. Исследования, выполненные в 60-70-е годы, в основном на человеческих цистинозных лейкоцитах, фибробластах и клетках лимфатических узлов, позволили установить, что базисным дефектом при цистинозе является накопление цистина в лизосомах. Для дальнейшего изучения биохимических процессов, лежащих в основе патогенеза ренального повреждения при цистинозе, наиболее подходящей моделью являются ренальные клеточные линии. В настоящее время для эксперимента доступны различные ренальные эпителиальные клетки. Недавно были изучены преимущества и недостатки каждого варианта. Доступные коммерческие клеточные линии, полученные от свиней (LLC-PK), опоссумов (OK) и собак (MDCK), доказали свою пригодность для изучения мембранного транспорта. Для более специфичного изучения транспортных систем в человеческих проксимальных канальцах были выработаны клеточные линии эпителия проксимальных канальцев человека, такие как НК-2 клеточная линия. Иммуортализация этих клеток была достигнута с помощью генов вируса папилломы человека HPV 16 E6/E7. Альтернативно используются изолированные перфузированные канальцы. В эксперименте большинство исследователей используют эти клеточные линии и модели, наполняя лизосомы цистином с помощью ДЭЦ. Преинкубация изолированных почечных канальцев с ДЭЦ приводит к значительному возрастанию уровня цистина, воспроизводя ситуацию, наблюдаемую при цистинозе.

Salton и Baum перфузировали с ДЭЦ проксимальные канальцы крыс и выявили снижение абсорбции глюкозы и бикарбоната. Было также продемонстрировано снижение уровня АТФ. Однако прямое токсическое действие ДЭЦ также было показано на контрольных фибробластах и ренальных НК-2 клетках. ДЭЦ ингибировал продукцию митохондриальной АТФ и вызывал образование супероксидных радикалов в контрольных клетках. Этого не происходит в цистинозных фибробластах при сопоставимом содержании цистина. Поэтому возникает вопрос о валидности ДЭЦ-модели для изучения цистиноза.

Для преодоления этих проблем были сделаны попытки получения культуры клеток непосредственно из цистинозных почек. Первично такие клеточные линии были получены из аутопсийных образцов. К сожалению, культивирование этих клеток было ограничено максимум семью пассажами.

Альтернативно моча человека может быть использована для выделения культуры клеток ренального эпителия, что доказали Sutherland и Bain, используя образцы, полученные от новорожденных. Этот метод был в дальнейшем более детально разработан в 80-е годы. Racusen et al. выделили отслоившиеся ренальные клетки из мочи больных цистинозом для создания линии из клеток проксимальных канальцев. Эти клетки были эпителиальными, и содержание цистина в них в 100 раз превышало норму. Этот способ был применён в сочетании с трансфекцией HPV 16 E6/E7 генов для получения клеточных линий, наиболее пригодных для изучения метаболизма при цистинозе. Преимущество этого метода состоит в том, что управляемая пролиферация позволяет получить однородный клеточный материал в достаточном количестве. Однако из-за высокой степени пролиферации уровень цистина в этих клетках только в 10 раз превышает содержание в клетках контроля, тогда как в почечных клетках у больных цистинозом уровень цистина в 60-350 раз больше нормы. Для ограничения уровня пролиферации была предложена другая модель эпителиальных клеток проксимальных канальцев (РТЕС), полученная с помощью чувствительного к температуре вектора SV40T tsA58 (SV40T), который стимулирует пролиферацию только при низкой температуре (33°C). Эти клетки носят название условно иммортализованных РТЕС (ciРТЕС). Когда ciРТЕС помещаются в среду с температурой 37°C, экспрессия антигена SV40T прекращается и пролиферация ингибируется, что позволяет клеткам дифференцироваться. Эта стратегия успешно применяется в комбинации с

трансфекцией гена человеческой теломеразной обратной транскриптазы (hTERT) для предотвращения репликативного старения клеток с последующей генерацией ciРТЕС из образцов мочи больных цистинозом. Уровень цистина в клетках этой линии в 37 раз выше по сравнению с контролем, что почти воспроизводит ситуацию, наблюдаемую in vivo.

Патогенез

Несмотря на то, что ген CTNS был клонирован более 10 лет назад, патогенез нефропатического цистиноза остаётся не до конца понятным. В настоящее время нет удовлетворительного объяснения механизма развития клеточной дисфункции и ренального синдрома Фанкони. В последние годы были предложены три основные гипотезы патогенеза цистиноза, включая нарушение метаболизма АТФ, активацию апоптоза и усиление оксидативного стресса в клетках.

Метаболизм АТФ при цистинозе. Первые исследования, выполненные после перфузии и экспозиции ДЭЦ через почечные канальцы, привели к гипотезе о повреждении метаболизма АТФ как причине нарушений реабсорбции при синдроме Фанкони. Было сделано предположение о том, что снижение уровня АТФ, приводящее к ингибированию активности натрий-калиевой АТФазы уменьшает трансцеллюлярный натриевый градиент, что приводит к снижению возможности натрийзависимого транспорта. В соответствии с этой гипотезой подобный механизм развития ренального синдрома Фанкони был описан у пациентов с митохондриальными заболеваниями. Кроме того, гистологические исследования клеток почечных канальцев у больных цистинозом обнаружили отёк митохондрий, предполагающий дефект клеточного метаболизма с уменьшением окислительного фосфорилирования. В ДЭЦ-модели, однако, цистин накапливается в лизосоме, но может легко её покинуть, в отличие от цистинозных клеток. Более того, ДЭЦ может обладать прямым токсическим воздействием на клетки. Поэтому экспериментальные данные, полученные после насыщения клеток с помощью ДЭЦ, необходимо оценивать критически. Высока вероятность того, что они не соответствуют патофизиологии цистиноза in vivo. Тем не менее несколько исследований, проведённых in vitro, описали уменьшение уровня АТФ в цистинозных клетках, включая фибробласты, полиморфноядерные лейкоциты и ренальные эпителиальные клетки.

Необходимо отметить, что метаболизм АТФ in vitro в основном связан с гликолитической активностью клеток, в то время как большая часть АТФ in vivo образуется в результате окислительного фосфорилирования, происходящего в митохондриях. Кроме того, при ренальном синдроме Фанкони in vivo нарушение тубулярного транспорта может приводить к нехватке субстратов для цитратного цикла, что ограничивает продукцию митохондриальной АТФ. В то же время снижение активности Na-K – АТФазы в цистинозных клетках до сих пор не было выявлено. Поэтому гипотеза, объясняющая механизм развития клеточных дисфункций при цистинозе исключительно нарушением метаболизма АТФ, представляется недостаточной.

Апоптоз при цистинозе. В цистинозных фибробластах, клетках проксимальных канальцев и ренальных тубулярных клетках, заполненных ДЭЦ, после запуска проапоптозных стимулов (TNF-α) был выявлен высокий уровень апоптоза. Гипотетически аккумуляция цистина повреждает лизосомы, вызывая протечку лизосомальных мембран и проникновение цистина в цитозоль, где он соединяется с проапоптозной протеинкиназой, стимулирующей апоптоз. Деформация клеток в виде «лебединой шеи», которая была описана в проксимальных канальцах у больных цистинозом, возможно объясняется запуском механизмов апоптоза. Последующее формирование атубулярных гломерул может приводить к прогрессирующей почечной недостаточности. Увеличение экспрессии каспазы-4 в участках почечной ткани с редуцированными проксимальными канальцами поддерживает эту гипотезу. Каспаза-4, представитель семейства цистеиновых протеаз, играет важную роль в программируемой клеточной смерти. Более того, у больных цистинозом в фибробластах и ренальных эпителиальных клетках выявляется увеличение количества аутофагосом и аутофаговых вакуолей, что позволяет предположить значение нарушений аутофагии в патогенезе цистиноза.

Метаболизм глутатиона при цистинозе. В последние годы исследования патогенеза цистиноза были сфокусированы на аномалиях метаболизма глутатиона (ГТ). Этот интерес возник после того, как Rizzo et al. выявили у больных с цистинозом увеличение выделения с мочой 5-оксопролина. Оксопролинурия не является специфичной только для цистиноза. Она отмечается и при некоторых других генетических заболеваниях, протекающих с нарушением метаболизма глутатиона, таких как дефицит 5-оксопролиназы (MIM 260005), и дефицит глутатионсинтетазы (MIM 266130). ГТ – главный внутриклеточный антиоксидант, защищающий клетки от оксидативного стресса. Теоретически аккумуляция цистина в лизосомах может уменьшать цитозольный пул цистеина, что ограничивает синтез ГТ, так как цистеин является субстратом для этого синтеза. Альтернативным объяснением оксопролинурии при цистинозе является дисфункция транспортера SLC5A8, что уменьшает реабсорбцию 5-оксопролина в проксимальных канальцах.

Уровень ГТ был измерен на нескольких клеточных моделях с неодинаковыми результатами. Уменьшение уровня ГТ было описано в цистинозных фибробластах и клетках проксимальных канальцев. Другое исследование с использованием фибробластов человека показало отсутствие изменений в базальном уровне ГТ, но выявило снижение ГТ после торможения синтеза АТФ в цистинозных клетках и после экспозиции оксидативными стимулами, что позволяет предположить нарушение активности при цистинозе АТФ-зависимого γ-глутамилового цикла. В противоположность этим результатам недавно одно исследование показало нормальное соотношение окисленного ГТ и восстановленного ГТ в ограниченном количестве цистинозных клеточных линий, что предполагает отсутствие изменений клеточного редокс-потенциала. Уровень ГТ нормален как в цистинозных HPV 16 E6/E7 проксимальных канальцевых клетках, так и в цистинозных ciРТЕС-линиях. ГТ-уровень в ciРТЕС сравним с уровнем, определяемым в здоровых тубулярных клетках (~ 5 mM). Однако в этих клеточных моделях была увеличена концентрация дисульфида глутатиона, что свидетельствовало об увеличении оксидативного статуса. Повреждение редокс-статуса в цистинозных ciРТЕС не влияло на оксидацию белков и жирных кислот, демонстрируя, что по крайней мере in vitro тотальная восстановительная способность клеток была достаточной для защиты от оксидативного повреждения. Более высокая метаболическая активность in vivo и почти исключительная генерация АТФ в митохондриях посредством окислительного фосфорилирования может приводить к более высокому образованию активных радикалов кислорода. Поэтому клетки больных цистинозом могут быть на самом деле более уязвимы, чем это выявляется in vitro.

Комбинированные клеточные модели цистиноза. Нарушение клеточного метаболизма ГТ может провоцировать апоптоз и быть причиной оксидативного повреждения митохондрий; с другой стороны, митохондриальная патология делает клетки предрасположенными к апоптозу и может уменьшать продукцию АТФ с дальнейшим нарушением синтеза ГТ. Поэтому различные гипотезы, сформулированные ранее, могут представлять различные грани единого каскада событий, который возникает от перегрузки лизосом цистином и приводит к нарушению функции клеток и снижению проксимальной канальцевой реабсорбции. Нестыковка данных, полученных в ряде исследований, может отражать различия в условиях экспериментов, стадиях клеточных дисфункций и неоднородность метаболических процессов клеток, используемых для изучения патогенеза заболевания.

Например, недавние работы показали, что внутриклеточный уровень цистеина не всегда снижается в цистинозных клетках, несмотря на невозможность выхода цистина из лизосом. Соответственно, маловероятно, что нарушение метаболизма ГТ первично вызывается недостатком субстрата для γ-глутамилового цикла. Другие факторы могут быть причиной нарушения метаболизма ГТ. Например, активность ГТ транспортеров OAT1/3 и MRP2/4 может модулировать апоптозный каскад, в то время как клетки проксимальных канальцев могут усваивать ГТ с базолатеральной стороны через натрий-зависимый SDCT-2 и OAT1/3. Более того, ГТ фильтруется через гломерулы и деградирует в цистеинил-глицин с помощью γ-глутамилтрансферазы щёточной

каймы эпителия проксимальных канальцев. Цистеинил-глицин может реабсорбироваться с помощью апикального транспортера PEPT2 и восстанавливать интрацеллюлярный пул цистеина. В дополнение к этой комплексной модели необходимо отметить, что уровень цистеина и уровень экспрессии CTNS м-РНК и цистинозина взаимосвязаны. Введение в клетку малой интерферующей РНК, понижающей экспрессию CTNS, приводит к увеличению содержания цистина и цистеина, в то время как изменение цистеин/цистин-редокс-статуса модифицирует уровень CTNS м-РНК.

Эти данные демонстрируют основную роль гена CTNS в регуляции метаболизма внутриклеточных тиолов, причём его экспрессия, в свою очередь, также активно регулируется. Лечение цистеамином позволяет уменьшить содержание внутриклеточного цистина, но также увеличивает пул внутриклеточного ГТ и в контроле и в цистинозных ciРТЕС и таким образом увеличивает способность клеток противостоять оксидатному стрессу. Данный эффект может быть полезен и при других хронических заболеваниях почек, при которых одним из механизмов прогрессии является усиление оксидативного стресса.

В целом эти данные проливают свет на комплекс метаболических взаимодействий, возникающих in vivo, особенно в реабсорбирующем эпителии, где транспорт растворов зависит от клеточной энергии и оксидативного статуса и при этом одновременно в процессе реабсорбции сберегаются ценные субстраты, которые позволяют клеткам генерировать энергию и управлять редокс-статусом. Наиболее вероятно, что полная последовательность событий, приводящих к развитию синдрома Фанкони при нефропатическом цистинозе, не может быть выяснена при использовании только модели in vitro и в дальнейшем потребуются более широкое изучение модели in vivo, такой как ctns^{-/-} нокаут мышь, более точно воспроизводящей заболевание у человека.

Перспективы исследований в будущем. Хотя внутриклеточная аккумуляция цистина является отличительным признаком цистиноза, последние научные данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что только одного этого механизма явно недостаточно для объяснения всех наблюдаемых при этой болезни клеточных альтераций и дисфункций. В пользу этого предположения свидетельствует персистенция ренального синдрома Фанкони у пациентов после деплеции цистина, полученной с помощью терапии цистеамином. Необходимо принимать во внимание и отсутствие полного синдрома Фанкони у ctns^{-/-} нокаут мышей, несмотря на высокий уровень цистина в канальцевом эпителии. Новые данные указывают на то, что лизосомы являются не только «перерабатывающими заводами», завершающими эндоцитозный цикл. Это динамичные органеллы, участвующие во многих физиологических процессах. Недавно выяснено, что лизосомы активно задействованы в процессе передачи сигнала в клетке, ремонте клеточной мембраны, фагоцитозе, ремоделировании тканей, гомеостазе холестерина, аутофагии, апоптозе и клеточном некрозе. Лизосомы постоянно взаимодействуют с другими органеллами с помощью механизмов kiss and run или путём слияния, что позволяет отвести им центральную роль при многих клеточных процессах.

Результаты последних экспериментов поддерживают гипотезу о том, что при цистинозе повреждается не только трансмембранный транспорт цистина, но и многие другие функции лизосом. Накопление аутофагосом в цистинозных клетках, продемонстрированное Sansanwal et al., может свидетельствовать о повреждении процесса слияния аутофагосомы с лизосомой. Так как аутофагия является защитным процессом, это нарушение может приводить клетку к гибели. Таким образом, детальное изучение патологии клеточного метаболизма, не ограничивающееся только накоплением цистина, будет являться одним из перспективных направлений будущих исследований при цистинозе. Углубление знаний о биогенезе лизосом и интрацеллюлярном транспорте субстратов, идентификация протеинов, взаимодействующих с лизосомой и с изоформами цистинозина, будет иметь большое значение не только для понимания патогенеза цистиноза, но также для расширения знаний о функции лизосом в целом.

Михаил КАГАН,
нефролог.

Оренбургская областная детская
клиническая больница.