

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР КАРДИОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.И. ЧАЗОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Аллахвердиев Эльвин Сулейман оглы

**Возможности оценки кислород-транспортной функции крови у пациентов с
идиопатической легочной гипертензией**

3.1.20 Кардиология

1.5.2 Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук
Мартынюк Тамила Витальевна
доктор биологических наук, профессор,
Максимов Георгий Владимирович

Москва – 2025

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Идиопатическая легочная гипертензия	12
1.1.1. Определение, историческая справка.....	12
1.1.2. Эпидемиология и прогноз.....	13
1.1.3. Патогенез	14
1.1.4 Сравнение идиопатической легочной гипертензии и легочной артериальной гипертензии, ассоциированной с системной склеродермией.....	16
1.2. Диагностика	18
1.2.1 Методы обследования	18
1.2.2 Диагностический алгоритм.....	23
1.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния	25
1.3.1 Методика КР-спектроскопии.....	25
1.3.2. Спектроскопия КР гемоглобина эритроцита	33
1.4 Подходы к лечению пациентов с ИЛГ.....	37
1.4.1. Современная ЛАГ- терапия в российской практике	37
1.4.2. Первый агонист простатиклиновых рецепторов- Селексипаг	39
1.4.3. Место комбинированной терапии в реальной практике.....	40
Глава 2. Материалы и методы	43
2.1. Общая характеристика	43
2.2. Дизайн исследования.....	45
2.3. Методы обследования	47
2.3.1. Отбор крови.....	47
2.3.2. Метод спектроскопии КР	47
2.3.3 Лабораторно-инструментальные методы исследования.....	52
2.3.4. Инструментальные методы исследования	52
2.4 Статистическая обработка результатов	53
Глава 3. Результаты	54
3.1. Особенности конформации гемопорфирина гемоглобина в крови из кубитальной вены и супензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и здоровых добровольцев	54

3.1.1. Экспериментальные и клинико-гемодинамические особенности проведения исследования по оценке конформации гемопорфирина и глобина гемоглобина методом КР-спектроскопии	54
3.1.2. Особенности конформации гема и глобина эритроцитов крови пациентов с ИЛГ	55
3.1.3. Особенности конформации гема и глобина мембраносвязанного гемоглобина у пациентов с ИЛГ	61
3.2. Анализ особенности конформации гемопорфирина гемоглобина в крови и суспензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с системной склеродермией.....	62
3.2.1. Клинико-инструментальная характеристика пациентов в группе ИЛГ и ЛАГ-ССД	62
3.2.2. Оценка кислород транспортной функции гемоглобина в группе ИЛГ и ЛАГ-ССД	68
3.3. Влияние ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг, на клинико-функциональный, гемодинамический статус больных и особенности конформации гемопорфирина гемоглобина	70
3.3.1 Исходная клинико-инструментальная характеристика пациентов с ИЛГ до назначения селексипага.....	70
3.3.2 Оценка долгосрочной эффективности селексипага в составе ЛАГ-специфической терапии	73
3.3.3. Динамика свойств конформации через 12 месяцев ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг	75
3.4 Разработка способа оценки тяжести состояния пациентов с идиопатической легочной гипертензией с использованием метода КР-спектроскопии.....	77
Глава 4. Обсуждение	81
Заключение	94
Выводы	96
Практические рекомендации	97
Список сокращений	98
Список литературы	100

Введение

Актуальность темы

Идиопатическая легочная гипертензия (ИЛГ) — это редкая форма прекапиллярной легочной гипертензии неустановленной этиологии с неблагоприятным прогнозом при отсутствии адекватного лечения [1,2].

Доказано, что патогенез ИЛГ является мультифакторным и включает различные биохимические и биофизические процессы в различных типах клеток. Известно, что повышение легочного сосудистого сопротивления (ЛСС) и давления легочной артерии (ДЛА) связано с вазоконстрикцией, обструктивным ремоделированием, вследствие комплексного нарушения структуры и функции стенок легочных сосудов, воспаления и тромбоза [1,2,3]. Важную роль в патогенезе заболевания играет гипоксия, которая может быть обусловлена изменениями состояния эритроцитов, например, способности переносить кислород в результате конформационных изменений в молекулах гемоглобина, приводящая к изменению их структуры и нарушению кислород-транспортной функции.

Для верификации диагноза ИЛГ необходимо проведение комплексного обследования, включающего в себя оценку симптомов, анамнестических сведений, данных физикального осмотра, эхокардиографии (ЭхоКГ) и инструментальных методов с целью проведения дифференциального диагностического поиска прекапиллярной легочной гипертензии и исключения иных форм легочной гипертензии. Для установления диагноза ИЛГ обязательным является проведение катетеризации правых отделов сердца (КПОС) для оценки параметров легочной гемодинамики и вазореактивности.

Гипоксия организма зависит от способности эритроцитов контролировать баланс газов в крови (кислород, углекислый газ, а также оксид азота), что зависит от молекулярных свойств гемоглобина (конформация гема и глобина), а также от морфологии, объема и вязкости мембранны клетки. Изменение сродства гемоглобина (Γ_b) к кислороду зависит от конформации гемопорфирина молекул Γ_b

и их возможности образовывать различные комплексы с лигандами, что можно эффективно исследовать при помощи спектроскопии комбинационного рассеивания (КР-спектроскопии) – оптического метода колебательной спектроскопии, позволяющий определять состав молекулярных связей гема (макропорфириновый цикл) и глобина в цельной крови.

Применение методики спектроскопии комбинационного рассеяния в кардиологии представляет собой большой научный и практический интерес, обладая высокой чувствительностью и специфичностью [4]. Ранее были опубликованы работы демонстрирующие, что с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния возможно исследовать морфологические параметры эритроцитов и конформацию гемопорфирина гемоглобина у пациентов с ишемической болезнью сердца и с недостаточностью кровообращения, были выявлены корреляции между величинами насыщения гемоглобина кислородом и долей оксигемоглобина в эритроцитах. У пациентов с недостаточностью кровообращения и ишемической болезнью сердца наблюдалось снижение способности гемоглобина отдавать кислорода и содержания оксигемоглобина [5].

В современных клинических рекомендациях патогенетическое лечение ЛАГ основывается на трех ключевых патофизиологических механизмах заболевания – это стимуляция системы эндотелина-1, коррекция дефицита вазодилататоров, а именно простациклина и оксида азота, которые способны значительно улучшить прогноз у пациентов с ИЛГ. Мы считаем, что методика спектроскопии комбинационного рассеяния может служить дополнительным методом оценки эффективности проводимой терапии, контролируя изменения кислород-транспортной функции крови. Важно, что метод спектроскопии КР позволяет контролировать состояние и конформацию гемоглобина как в цельной крови, так и выделенных эритроцитах. Эта особенность метода свидетельствует о большом потенциале его эффективного использования в клинической медицине.

Таким образом, изучение способности гемоглобина связывать кислород, а именно анализ различных его конформаций, позволит улучшить оценку клинико-

функционального состояния больных с ИЛГ как на стадии диагностики, так и при оценке эффективности проводимой терапии. Данный подход подчеркивает не только важную научную значимость работы, но также и ее практическую значимость в современной медицине.

Цель исследования

Изучить особенности кислород-транспортной функции крови с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния в зависимости от тяжести пациентов с идиопатической легочной гипертензией и динамики их состояния в результате лечения, включающего агонист рецепторов простатиклина селексипаг.

Задачи исследования

1. Изучить конформацию гемопорфирина гемоглобина эритроцитов в крови и суспензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и здоровых добровольцев.
2. Сопоставить изменения конформации гемопорфирина гемоглобина в крови и суспензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с системной склеродермией.
3. Оценить динамику изменений конформации гемопорфирина гемоглобина в зависимости от эффективности ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг.
4. Разработать способ оценки тяжести состояния пациентов с идиопатической легочной гипертензией с использованием метода спектроскопии комбинационного рассеивания.

Научная новизна

В ходе исследования впервые выявлены изменения конформации гемопорфирина гемоглобина в эритроцитах крови, характеризующие способность гемоглобина связывать кислород у пациентов с идиопатической легочной гипертензией в сравнении со здоровыми добровольцами. Сопоставлены конформационные изменения гема гемоглобина эритроцитов в крови у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с системной склеродермией (ЛАГ-ССД). Впервые разработана методология контроля терапии идиопатической легочной гипертензии с помощью изучения изменений сродства гемоглобина эритроцита к кислороду методом КР-спектроскопии, что позволило судить о изменениях кислород-транспортной функции эритроцитов при патологии и на фоне терапии. Впервые доказана возможность определения эффективности ЛАГ-специфической терапии с помощью КР-спектроскопии.

Практическая значимость

В результате исследования разработана оригинальная методика, основанная на оценке конформационных изменений состояния гемопорфирина гемоглобина у пациентов с ЛАГ для применения в рутинной клинической практике, которая позволяет, во-первых, неинвазивным способом оценивать степень тяжести легочной гипертензии у пациентов с впервые установленным диагнозом, во-вторых, определять потребность в проведении повторной КПОС в ходе дальнейшего наблюдения для определения необходимости в эскалации ЛАГ-специфической терапии.

Методология и методы исследования

Методологию этого исследования разрабатывали с учетом обозначенных целей. Для обследования и лечения пациентов с легочной артериальной гипертензией были использованы современные подходы. Всего было проведено скрининг 102 пациентов с ЛАГ, однако в исследование вошли 83 пациента — из них 63 с ИЛГ и 20 с ЛАГ-ССД. Контрольную группу составили 10 «здоровых добровольцев». На первом этапе исследования с помощью КР-спектроскопии оценивали кислород-транспортную функцию крови у пациентов с диагнозом ИЛГ и у « здоровых добровольцев», исследуя кровь, взятую из кубитальной вены. На втором этапе выделяли две группы по 20 человек: одну с подтверждённым диагнозом ИЛГ, другую — с ЛАГ-ССД. С помощью КР-спектроскопии выполнялся контроль гемодинамических параметров, а также особенностей кислород-транспортной функции крови в обеих группах. Третий этап включал 14 пациентов с ИЛГ, находившихся на комбинированной ЛАГ-специфической терапии, включая селексипаг, в данном исследовании осуществлялось сопоставление клинических данных, параметров гемодинамики, а также анализировалась конформация гемоглобина с применением КР-спектроскопии. За данной группой проводилось наблюдение продолжительностью 12 месяцев. На заключительном, четвёртом этапе, были включены 10 пациентов для реализации методики оценки тяжести ИЛГ с помощью КР-спектроскопии. Обработка полученных данных осуществлялась проверенными статистическими методами, что позволило успешно решить поставленные научные задачи.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При оценке кислород-транспортной функции гемоглобина методом КР-спектроскопии в эритроцитах у пациентов с ИЛГ в сравнении со здоровыми добровольцами установлено, что особенности связывания и переноса газов при

ИЛГ обусловлены «куполообразной» конформацией гема, близкой к дезоксигенированной форме Гб.

2. При комплексном сравнительном анализе групп пациентов с ЛАГ различной этиологии выявлено, что пациенты с ИЛГ характеризуются большей степенью легочной гипертензии и меньшей выраженностью нарушений кислород-транспортной функции при сопоставимом функциональном классе с группой ЛАГ-ССД.

3. Применение методики КР-спектроскопии у пациентов с ИЛГ позволяет оценивать эффективность ЛАГ-специфической терапии на основании оценки изменений конформации гемоглобина, в частности, снижение выявления «куполообразной» конформации.

4. Изучение кислород-транспортной функции крови методом КР-спектроскопии вносит дополнительный вклад в оценку тяжести пациентов с ИЛГ при установлении диагноза и динамическом наблюдении и позволяет обосновать необходимость инвазивного дообследования для решения вопроса об эскалации терапии.

Внедрение результатов в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую и научную практику отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность полученных в диссертационной работе выводов обеспечивается в результате достаточной репрезентативности исследуемой выборки пациентов, а также в результате применения современных лабораторных, клинических и инструментальных методик. Результаты исследования

представлены автором лично на следующих российских и международных конгрессах и конференциях: Интеграция наук: междисциплинарность в медицине-2022, Кардиология на Марше-2023, Всероссийский конгресс «Легочная гипертензия 2023», The Asian Pacific Society of Cardiology 2024, Dubai, UAE 2024. International Union for Pure and Applied Biophysics 2024. Kyoto, Japan 2024.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно осуществлял все этапы научного исследования- от разработки концепции, подбора и анализа профильной литературы до отбора и сопровождения пациентов, организации экспериментальной части исследования и формирования данных. Овладел современными физико-химическими методами анализа биологических тканей и клеток, в том числе — спектроскопией комбинационного рассеяния, лазерной диагностикой, оптической микроскопией и элементами биоматематического моделирования. Он изучал молекулярные механизмы взаимодействия белков, функционирование биомембран и клеточных структур в норме и при патологии, занимался анализом процессов транспорта и обмена веществ на разных уровнях биологической организации.

Кроме того, принимал участие в статистической обработке, интерпретации полученных результатов и последующим их анализе. Работу над диссертацией автор выполнил лично, подготовил и разместил публикации в признанных высшей аттестационной комиссией изданиях, а также представлял основные результаты на различных научных конгрессах и конференциях.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных в перечне Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 2 печатные работы индексируемые в Scopus, а также 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего публикации отечественных и зарубежных авторов. Текст диссертации иллюстрирован 12 таблицами и 15 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Идиопатическая легочная гипертензия

1.1.1. Определение, историческая справка

Идиопатическая легочная гипертензия относится к редким разновидностям легочной артериальной гипертензии (ЛАГ) и проявляется значительным увеличением легочного сосудистого сопротивления (ЛСС) и уровня давления в легочной артерии в условиях покоя. Для оценки вышеперечисленных характеристик применяется методика катетеризации правых отделов сердца (КПОС). В норме среднее давление в легочной артерии в состоянии покоя составляет 14 ± 3 мм рт. ст., но не превышает 20 мм рт. ст. [6,7]. По результатам 6-го Всемирного симпозиума по легочной гипертензии, а также согласно современным Европейским и Российским рекомендациям по ЛГ были приняты новые критерии постановки диагноза ИЛГ: повышение среднего давления в легочной артерии (ср.ДЛА) > 20 мм рт. ст. в покое по данным катетеризации правых отделов сердца (КПОС), давление заклинивания легочной артерии (ДЗЛА) ≤ 15 мм рт.ст., ЛСС > 2 Ед Вуда, что характеризует прекапиллярную форму ЛГ. Для исключения ИЛГ необходимо исключить все потенциальные причины формирования прекапиллярной ЛГ, такие как вторичные формы ЛАГ, заболевание легочной ткани, хроническую тромбоэмболическую легочную гипертензию и иные этиологические факторы (группа 5) [6].

Первые работы в области первичной легочной гипертензии (ПЛГ), в которых до 2003 года ИЛГ наименовалась как ПЛГ, были посвящены исследованию клинико-патоморфологических особенностей, а также поиску этиологических факторов, которые приводили к данному заболеванию. В конце XIX века была опубликована работа «О склерозе легочной артерии»: в ней описывалась картина склероза легочных сосудов при отсутствии патологии со стороны сердца и легких [8]. Информация о клинических характеристиках постепенно стала появляться,

начиная с 1900 года, когда А. Аурза начал описывать клинические особенности течения состояния, поэтому заболевание и получило название болезни Аэрза. В начале 40-ых годов S. De Navasquezetal применил термин «так называемая легочная гипертензия» [9]. В дальнейшем в медицинской литературе применялся термин «легочная гипертензия», однако термин «первичная легочная гипертензия» стали использовать позднее, а именно в 1951 году.

Впервые в нашей стране проблематику первичной легочной гипертензии осветил профессор Н.М. Мухарлямов, который детально описал клинические признаки, возможные причины и особенности течения данного заболевания. В 2003 году на 3-м Всемирном симпозиуме по легочной гипертензии термин «первичная легочная гипертензия» заменили на «идиопатическая легочная гипертензия» [10,11].

1.1.2. Эпидемиология и прогноз

Известно, что распространенность ИЛГ составляет 6 случаев на миллион взрослого населения в год с частотой встречаемости 48–55 случаев на миллион в популяции соответственно [12,13,14]. Ранее считалось, что заболеванием страдают в большей степени молодые люди, в основном женщины. Однако самые последние данные сообщают о том, что ЛАГ в настоящее время часто диагностируется у пожилых пациентов (т. е. у пациентов в возрасте ≥ 65 лет, у которых часто наблюдаются сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, что приводит к более равномерному распределению между полами) [15,16,17]. Проведенный анализ данных современных регистров по ИЛГ демонстрирует заметные изменения эпидемиологических характеристик заболевания за последние десятки лет. В свою очередь, средний возраст пациентов с ИЛГ в зарубежных регистрах составляет от 45 до 65 лет [18].

Несмотря на большее количество данных о ЛГ, значительный разрыв понимания симптомов и диагноза ЛГ по-прежнему существует. Средний интервал между появлением симптомов и диагностикой ЛГ в современных регистрах

составляет около 24 месяцев от начала симптомов. С момента разработки современной ЛАГ-специфической терапии продолжительность жизни пациентов значительно изменилась, ранее она составляла около 2,8 лет, однако в настоящее время на фоне успешного применения современных препаратов достигает 7 лет [19,20]. Более того, согласно данным NIH, для пациентов с ИЛГ одногодичная, трехлетняя и пятилетняя выживаемость на данный момент составляют 91%, 74%, 65% [20].

1.1.3. Патогенез

Одним из ключевых предпосылок возникновения ИЛГ считается нарушение целостности и функции эндотелиального слоя, приводящее к дисбалансу между сосудосуживающими агентами (эндотелин 1, тромбоксан, ингибитор тканевого активатора плазминогена) и сосудорасширяющими медиаторами, такими как оксид азота (NO), простациклин и брадикинин [21,22,23].

Известно, что у больных с ИЛГ содержание TxB2 и эндотелина-1 (ЭТ-1) существенно превышало норму, в то время как уровень метаболитов простациклина и NO не изменялся [24]. Увеличение продукции простациклина и NO можно рассматривать в качестве возможной компенсаторной реакции в ответ на эффекты вазоконстрикторов, а также ангиотензина II [25]. Секреция различных веществ, а именно вазоактивных медиаторов, приводит к образованию тромбозов *in situ*, изменяя состояние легочного сосудистого русла. Все это приводит к повреждению эндотелия и в конечном счете к ремоделированию стенок сосудов [26].

Доказано, что в патогенезе заболевания участвуют генетические и молекулярные нарушения, а также воспалительные изменения [27,28].

К ключевым патофизиологическим процессам, лежащим в основе ИЛГ, относятся: сужение просвета легочных сосудов, уменьшение площади сосудистой сети легких, потеря эластичности легочных сосудов, закупорка и структурная перестройка сосудов. Повреждение эндотелиального слоя служит инициальным

фактором, приводящим к ремоделированию легочных артерий, в результате чего в патологию вовлекаются все компоненты сосудистой стенки [29,30]. При данном заболевании кровеносные сосуды затрудняют перекачку крови к легкому из-за ограничения легочного кровообращения. Увеличение сопротивления в легочной артерии при ИЛГ связано с процессами сужения сосудов, их структурной перестройкой и формированием тромбов. По мере прогрессирования заболевания продолжающееся повышение давления приводит к дальнейшему ремоделированию легочной сосудистой сети, что усугубляет выраженность гипертензии. В результате роста легочного сосудистого сопротивления происходит увеличение систолического давления в правом желудочке с целью поддержания адекватного сердечного выброса. Это объясняет нарастание давления и снижение кровотока на фоне роста сопротивления. Продолжение патологических изменений сосудов и стойкое повышение ЛСС у больных ИЛГ приводят к развитию декомпенсации функций правого желудочка и увеличивают риск летального исхода [29].

Согласно современным данным по изучению сосудистой системы у пациентах с ЛГ, показали, что воспаление играет важную роль и может способствовать ремоделированию легочных сосудов [30]. Дальнейшее изучение роли воспаления в данном заболевании привело к выводу, что уровни воспалительных цитокинов (IL-1 β , IL2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 и TNF α) были повышенны у пациентов с ЛГ, а показатели IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 предсказывали выживаемость при ЛГ [31]. IL-6 был наиболее интенсивно изучен при ЛГ [31,32].

Известно, что дисфункция митохондрий, которая характеризуется снижением синтеза АТФ, играет важную роль в дисфункции ПЖ при ЛАГ [33]. При ЛГ в ПЖ происходит переход от окислительного к анаэробному метаболизму глюкозы. Для компенсирования сниженной метаболической эффективности анаэробного гликолиза поглощение глюкозы ПЖ увеличивается, чтобы генерировать больше АТФ [34]. В легочной артерии повышается окисление жирных кислот, а ингибирование окисления жирных кислот с использованием

ранолазина или триметазидина приводило к взаимному увеличению окисления глюкозы и улучшало функцию ПЖ (цикл Рэндалла) на животных моделях [35].

В ходе ряда исследований выявлена моноклональная природа эндотелиальных клеток в плексиформных структурах у пациентов с ИЛГ, а также нарушение регуляции HIF-1 α , что указывает на неконтролируемый клеточный рост и устойчивость к апоптозу [36]. Дисбаланс между вышеперечисленными процессами приведет к повышению ЛСС и декомпенсации ПЖ. Функция последнего будет определять прогноз пациентов с ИЛГ.

Резюмируя вышесказанное, патогенез ИЛГ является мультифакторным, включающим множественные биохимические процессы в различных типах клеток. В результате вышеупомянутых морфологических и транспортных изменений в сосудистой системе возможно формирование гипоксических процессов у данных пациентов, которое обусловлено гемодинамикой и сопротивлением сосудов, а также способностью эритроцитов переносить кислород, углекислый газ, и оксид азота, при этом важно, что молекулярные процессы в эритроцитах крови больных можно контролировать с помощью методики спектроскопии комбинационного рассеяния, которая также позволяет оценивать активный центр молекулы гемоглобина.

1.1.4 Сравнение идиопатической легочной гипертензии и легочной артериальной гипертензии, ассоциированной с системной склеродермиеей

Легочная артериальная гипертензия, ассоциированная с системной склеродермиеей (ЛАГ-ССД), требует комплексного подхода к диагностике и лечению. Системная склеродермия (ССД) характеризуется преждевременным фиброзом и васкулитом, что напрямую влияет на функциональное состояние лёгких и сердечно-сосудистой системы. Распространённость ССД колеблется от 138 до 286 случаев на миллион населения [37]. Еще в 2013 году рабочая группа ACR-EULAR пересмотрела диагностические критерии системной склеродермии,

так как не для всех пациентов удавалось установить диагноз, особенно с висцеральной и лимитированной формой. В первую очередь это связано с тем, что кожные проявления у таких пациентов выражены слабо, поэтому был сделан акцент на внедрение дополнительных критериев диагностики, которые позволили бы распознать заболеваниях на ранних стадиях. Такой подход способствует снижению риска осложнений и дает возможность раньше начать лекарственную терапию [38,39,40]. В отдельной форме ЛАГ-ССД является следствием легочно-сосудистой патологии, а в свою очередь в диффузной форме включает в себя интерстициальный фиброз легких. Доказано, что развитие ЛГ связано с более тяжелой формой ССД. Определенные маркеры: anti-Scl-70 (антитела к топоизмеразе I), антицентромерные антитела, антитела к тромбоцитарному фактору 4, связаны с высоким риском появления ЛГ [38].

В последние годы исследования показывают, что определенные гены, которые присутствуют на мононуклеарных клетках крови пациентов с идиопатической легочной гипертензией, могут выявляться у больных с ЛАГ-ССД [38]. Важно также отметить, что специфика генетических профилей может влиять на тяжесть течения легочной гипертензии. В свою очередь оценка тяжести осуществляется посредством гемодинамических величин и функционального состояния, при этом выявлены существенные связи между показателями размеров ПП и СИ [38,41]. Группа пациентов с ЛАГ-ССД существенно отличается по демографическим и клиническим характеристикам-преобладание женщин старше 60 лет с выраженной коморбидностью и худшей выживаемостью по сравнению с больными ИЛГ очевидно. Помимо этого, выраженная тяжесть заболевания и низкая эффективность медикаментозного лечения характерны для данной категории пациентов [38,42].

На начальных этапах лечение ЛАГ-ССД неспецифична, что в свою очередь вызывает сложности в постановке диагноза, еще большую сложность вызывает та когорта пациентов, у которых имеется интерстициальный фиброз легких. Вдобавок, такой показатель, как транстрикуспидальный градиент давления, обнаруживается не у всех пациентов [38,43,44]. Разработка иных алгоритмов

диагностики является актуальной задачей, так как позволяет отобрать тех пациентов, которым будет необходимо выполнение КПОС. В настоящий момент в диагностический алгоритм входит выполнение функциональных легочных тестов, определения уровня биомаркеров [38]. Существует специализированный алгоритм DETECT (Evidence-Based Detection of Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis), использующий ряд параметров: наличие/отсутствие телеангиоэктазий и антицентромерных антител, отклонение ЭОС вправо по данным ЭКГ, определение ФВД, площадь ПП, а также транстриkuspidального градиента давления по ЭхоКГ, он позволяет в рутинной практике выявлять ЛАГ на ранних стадиях [38]. В ежедневной клинической практике врача хорошо зарекомендовал себя скрининговый алгоритм ASIG, основанный на данных исследования функции внешнего дыхания. Тест считается положительным при уменьшении диффузной способности легких $<70\%$ и отношение форсированной жизненной емкости легких к диффузной способности легких $\geq 1,8$, а также при превышении уровня NT-proBNP выше 210 пг/мл. Пациент, соответствующие хотя бы одному из указанных критериев, направляются на обследование с помощью ЭхоКГ. Для исключения других причин легочной гипертензии проводится дополнительная оценка [38]. Успешная диагностика и лечение ЛАГ-ССД является возможной только при реализации комплексного подхода, который включает в себя использование самых современных технологий в области медицины. Прогноз пациентов с ЛАГ-ССД будет зависеть от времени начала проведения медикаментозного лечения, а также от своевременной диагностики.

1.2. Диагностика

1.2.1 Методы обследования

Диагностика ИЛГ осложняется неспецифичностью проявлений, что затрудняет раннее выявление и приводит к маскировке болезни под другие

сердечно-сосудистые заболевания. Верификация диагноза зачастую происходит уже на поздних этапах, когда заболевания значительно прогрессировало. По данным международных регистров, включая США и Францию, период от первых симптомов до окончательной диагностики обычно не превышает 2,25 года, в Австралии этот срок составляет около 3,9 года. В России, согласно опубликованным данным, промежуток между появлением симптомов и установлением диагноза, как правило, составляет не более двух лет [44,45].

Часто у пациентов с ИЛГ возникают неспецифические жалобы, обусловленные явлением правожелудочковой недостаточности. Из жалоб пациентов чаще всего беспокоит одышка, общая слабость, в некоторых случаях при прогрессировании симптоматики- синкопе [1].

Инструментальные исследования

Электрокардиография

Изменения на ЭКГ включают в себя гипертрофию ПЖ, гипертрофию ПП [46]. У пациентов с подозрением на ЛГ отклонение электрической оси сердца вправо имеет высокую прогностическую ценность [47]. Важно помнить, что у больных неизмененная ЭКГ не исключает наличие ЛГ, однако в сочетании с нормальным уровнем биомаркеров связана с низкой вероятностью данного заболевания у пациентов [48].

Рентгенография органов грудной клетки

У пациентов с ИЛГ в ходе рентгенографии органов грудной клетки выявляются нарушения в виде дилатации центральной легочной артерии с повышением прозрачности легочных полей [49]. Также может наблюдаться

обеднение легочного рисунка, как проявление морфологический изменений с обструктивным ремоделированием дистального легочного сосудистого русла. Таким образом, рентгенограмма помогает врачам в диагностике ЛГ на начальных стадиях. В тяжелых случаях ЛГ на рентгенограмме выявляется выбухание ствола и левой ветви легочной артерии. К положительнной стороне данного метода следует отнести доступность в медицинских учреждениях.

Трансторакальная эхокардиография

Одним из главных методов диагностики ЛГ, который позволяет оценить давление в легочной артерии неинвазивным методом, провести диагностический поиск, судить о прогрессировании заболевания и определить тактику ведения пациентов, является ЭхоКГ. При выполнении ЭхоКГ возможно исключить другие причины развития ЛГ [50]. Выполнение данного метода необходимо для всех пациентов с ЛГ, особенно с целью дифференциальной диагностики, однако для точного определения гемодинамических параметров необходимо выполнение КПОС [3].

Катетеризация правых отделов сердца

КПОС является «золотым стандартом» для верификации диагноза ИЛГ, позволяет точно измерить ДЛА и ДЗЛА, рассчитать СВ и ЛСС. Диагностическими критериями ИЛГ и ЛАГ- группы 1 является триада гемодинамических параметров: $\text{ср.ДЛА} > 20 \text{ мм рт.ст.}$ и $\text{ЛСС} > 2 \text{ ЕД}$. Вуда при нормальном ДЗЛА $\leq 15 \text{ мм рт.ст.}$ [1]. Параметры гемодинамических данных позволяют прогнозировать исход пациентов. Повышение среднего давления правого предсердия (ПП), низкий сердечный выброс (СВ) и сердечный индекс (СИ) и сатурация венозной крови кислородом ассоциируется с высоким риском неблагоприятного исхода [3].

Рекомендовано проведение острых фармакологических проб во время КПОС для оценки вазореактивности легочных сосудов и понимания о необходимости применения антагонистов кальция. Чаще всего в качестве препаратов для фармакологических проб используют вазодилататоры (НО Илопрост). Положительная ОФП считается при снижении ср.ДЛА >10 мм рт. ст. с достижением абсолютной величины <40 мм рт. ст. в сочетании с увеличением или отсутствием динамики СВ [3,6].

Магнитно-резонансная томография сердца

Метод магнитно-резонансной томографии сердца (МРТ) используется в редких случаях у больных ИЛГ для оценки морфологических и функциональных изменений. Преимуществом метода является отсутствие лучевой нагрузки, неинвазивность. Данное исследование позволяет оценить объемы обоих желудочков сердца (конечно-диастолический объем, конечно-систолический объем), жесткость ЛА, а также рассчитать ударные объемы [3]. МРТ предоставляет полезную прогностическую информацию у пациентов с ЛГ как на исходном уровне, так и в период наблюдения [51].

Тест 6-минутной ходьбы

Пройденная дистанция 6-минутной ходьбы (Д6МХ) – это один из самых простых, но при этом очень важный метод диагностики ЛГ, поскольку с его помощью оценивают прогноз для пациента, параллельно измеряя насыщение кислорода крови по данным пульсоксиметрии [52]. Пройденное расстояние в ходе теста шестиминутной ходьбы обратно коррелирует с функциональным классом заболевания. Снижение уровня кислородной сатурации артериальной крови более

чем на 10% в процессе тестирования рассматривается как маркер неблагоприятного прогноза у больных легочной гипертензии [6,53].

Исследование функции внешнего дыхания

Оценка функции внешнего дыхания (ФВД) позволяет исследовать нарушения, которые могут непосредственно влиять на развитие ЛГ [54]. Для пациентов с ИЛГ обычно характерны нормальные показатели или легкая рестрикция [3]. Поскольку у пациентов с ЛГ обычно отмечается умеренная гипоксемия из-за нарушений вентиляционно-перфузационного соотношения, анализ газов артериальной крови является обязательным тестом. Оценка гипоксемии особенно важна для диагностики ЛГ группы III, связанная с патологией легких. Аномально низкий уровень DLCO, определяемый как 45% от прогнозируемого, связан с плохим исходом. При исследовании газов крови у пациентов с нарушениями легких отмечается снижение парциального давления кислорода в сочетании с нормальным или повышенным парциальным давлением углекислого газа [55].

Кардиопульмональный тест

С помощью данного метода исследования исследуется вентиляция и газообмен во время физической нагрузки. У пациентов с ЛАГ можно наблюдать снижение показателя анаэробного порога и пикового потребления кислорода [3,56].

Лабораторные исследования

В рамках диагностики и для мониторинга эффективности лечения у пациентов с ИЛГ проводится общий и биохимический анализ крови, коагулограмма, исследование уровня D-димера, а также оценка функции щитовидной железы [57]. Всем больным с легочной артериальной гипертензией показан скрининг на ВИЧ-инфекцию [3]. При выявлении сниженных объемов легких рекомендуется дополнительное обследование для исключения интерстициальных заболеваний, при которых также отмечается умеренное снижение парциального давления кислорода и углекислого газа [6]. Обычно на ранней стадии результаты лабораторных тестов остаются в пределах нормы; при развитии дисфункции правого желудочка или сердечной недостаточности определяется повышение концентрации мозгового натрийуретического пептида (BNP) и его N-терминального фрагмента (NT-proBNP), а также мочевой кислоты, возможны изменения активности печени и рост уровня креатинина [3].

1.2.2 Диагностический алгоритм

Существенным моментом методологии успешного лечения ЛГ является соблюдение диагностических алгоритмов согласно клиническим рекомендациям. Первым этапом в алгоритме диагностики у пациентов с клиникой одышки является обследование по месту жительства, где при необходимости пациенты будут направлены в экспертный центр по лечению ЛГ. Особое внимание стоит обратить пациентам с ЛАГ на заболеваний соединительной ткани, ЛАГ на фоне врожденных пороков сердца, ЛАГ на фоне портальной гипертензии, ЛАГ на фоне ВИЧ инфекции, а также пациентам с ХТЭЛГ, такая категория пациентов должна быть незамедлительно направлена в экспертный центр по лечению ЛГ [1]. Доказано, диагностический алгоритм можно разделить на три этапа. Первый этапом врач по месту жительства (терапевт, кардиолог, пульмонолог, ревматолог) может заподозрить заболевание, консультируя пациентов с подозрением на ЛГ,

тщательно собирая анамнез пациента и проводя физикальный осмотр. Также важной составляющей является выполнение неинвазивных обследований: измерение артериального давления, частоты сердечных сокращений, пульсоксиметрии, регистрации ЭКГ в покое, рентгенографии органов грудной клетки. ЭхоКГ в диагностике ЛГ позволяет оценивать вероятность наличия ЛГ. Пациенты с факторами риска должны отправлены в экспертный центр для принятия решение о дальнейшей тактики лечения [1]. На следующем этапе обследования для выявления патологии используется комплекс неинвазивных методов, среди которых ЭхоКГ и спирометрия, позволяющие оценить состояния левых отделов сердца. Рентгенография и компьютерная томография органов грудной клетки с применением контрастирования необходимы для поиска заболеваний легких различной природы. Для исключения ХТЭЛГ проводится методика перфузационной сцинтиграфии, способная выявить дефекты легочного кровотока различной локализации.

Следующим этапом больные направляются на КТ с контрастированием, при подозрении на ХТЭЛГ данная группа пациентов также направляется в экспертный центр. Финальным этапом является комплексное обследование в экспертном центре для верификации диагноза ЛГ, проводится в том числе инвазивное дообследование, в объеме КПОС (для определения гемодинамического типа ЛГ) с выполнением вазореактивного теста при необходимости (Рисунок 1) [1].

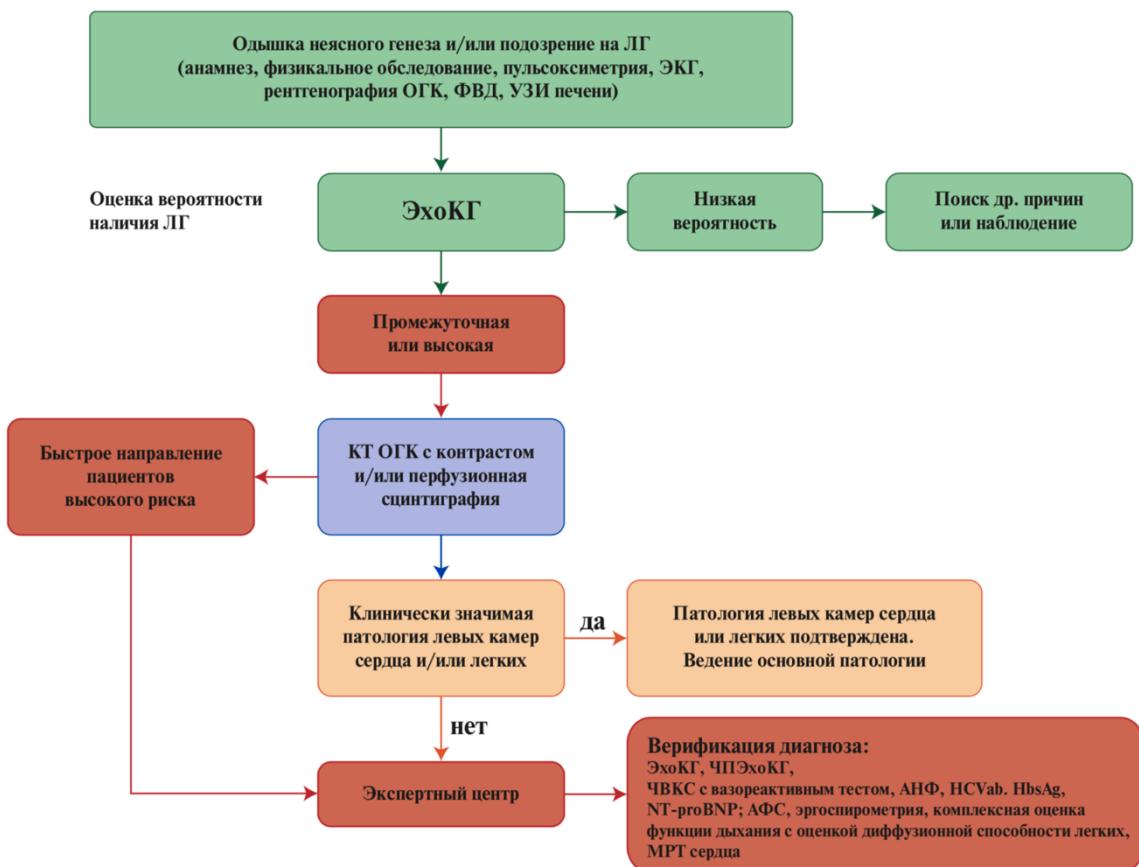


Рисунок 1. – Алгоритм диагностики легочной гипертензии [1].

1.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния

1.3.1 Методика КР-спектроскопии

КР-спектроскопия — это оптический метод, в котором используется эффект неупругого рассеяния света для получения информации о химическом составе и конформации молекул, что важно в ходе диагностики и терапии органов и отдельных клеток [58]. Тщательное изучение этих изменений частоты позволяет получать важные данные о химическом составе и молекулярном составе образца.

Колебательная спектроскопия представляет собой совокупность методов исследования молекулярных колебаний, среди которых инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия) занимают ведущие позиции. Метод КР основан на анализе взаимодействия

лазерного излучения с молекулами образца. При этом происходит рассеяние света с изменением его частоты, известное как комбинационное рассеяние. Характер этого изменения уникален для каждой молекулы и определяется её колебательными модами. КР-спектроскопия обладает высокой информативностью и чувствительностью, что делает её перспективным методом диагностики. Неразрушающий и минимально инвазивный характер метода, а также простота пробоподготовки, открывают широкие возможности для применения КР-спектроскопии как *in vitro*, так и *in vivo*.

Благодаря неинвазивности, а также высокой чувствительности данного метода, существует значительный спрос на его использование в биомедицинских исследованиях. К примеру, методика КР-спектроскопии активно применяется в онкологии для успешного раннего выявления и, следовательно, улучшения результатов лечения пациентов. КР-спектроскопия предлагает ряд преимуществ, включая неразрушающее исследование образцов, быстрый анализ и возможность исследования ткани без необходимости использования внешних контрастных агентов. Чтобы проиллюстрировать его применение в диагностике рака, КР-спектроскопия демонстрирует свою способность выявить различия здоровую и раковую ткань молочной железы, тем самым помогая в оценке хирургических границ и улучшении стратегий лечения [59-63].

В области хирургии КР-спектроскопия нашла также большое применение, способствуя облегчению идентификации и дифференциации тканей. Ткани имеют различные КР-спектры из-за их уникального молекулярного состава, хирурги могут использовать анализ этих сигналов. Кроме того, чувствительность КР спектроскопии к молекулярным изменениям позволяет обнаруживать тонкие модификации биомолекул, вызванные болезнью, что делает ее перспективным инструментом для раннего выявления и контроля заболеваний. КР-спектроскопия служит ценным инструментом для извлечения соответствующей информации относительно оксигенации тканей и перфузии крови. Эти данные имеют особое значение в контексте реконструктивной хирургии, где оценка жизнеспособности тканевого лоскута имеет большое значение. Непрерывный мониторинг подачи

кислорода и кровотока на протяжении всей процедуры служит профилактической мерой против возможных осложнений и способствует принятию обоснованных решений, тем самым гарантируя успешные результаты [64,65].

Очевидно, что анализ результатов КР исследований в медицине требует опыта в спектральном анализе и знакомства с молекулярными колебаниями. Хирургам также может потребоваться обучение для грамотного использования и интерпретации данных КР-спектроскопии. КР-спектроскопия обещает повысить хирургическую точность и эффективность лечения пациентов. Применение КР в хирургии, начиная от характеристики тканей и заканчивая определением границ и мониторингом уровня лекарственных средств в реальном времени, весьма обнадеживающее. По мере развития технологий и преодоления вышеуказанных препятствий КР станет бесценным инструментом в руках хирургов, потенциально революционизируя интервенционные процедуры [66-70].

КР-спектроскопия также активно применяется в области фармакологии, поскольку облегчает понимание взаимодействия лекарственных средств, механизмов действия и потенциальных побочных реакций. КР-спектроскопия является мощным аналитическим инструментом для исследования фармацевтических веществ, предоставляя ценную информацию об их молекулярных структурах. КР-спектроскопия - неинвазивная и быстрая технология, которая позволяет исследователям и врачам получать доступ к критически важным данным о молекулах лекарственных средств, тем самым улучшая разработку лекарственных средств, персонализированную медицину и общий уход за пациентами [71-73].

КР-спектроскопия позволяет быстро идентифицировать незнакомые или поддельные лекарственные средства. Сравнивая КР-спектры образца с базой данных известных спектров лекарственных средств, специалисты кардиологи могут быстро проверить легитимность фармацевтических препаратов, обеспечивая благополучие пациентов [74]. Данная методика также играет ключевую роль в идентификации лекарств, различая конкретные активные фармацевтические ингредиенты и их формулы.

Метод КР-спектроскопии может эффективно применяться в молекулярной биологии для анализа биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы [75]. С помощью КР-спектроскопии можно также предоставлять информацию о конформации и структурных характеристиках молекул дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК). Метод используется для идентификации различных конформаций нуклеиновых кислот и выявления структурных изменений, вызванных мутациями или связыванием с другими молекулами. КР-спектроскопия также может быть применена для анализа и дифференциации различных последовательностей матрицы РНК (мРНК) [76]. Создание эффективных и действенных методов для быстрой и точной идентификации мРНК является обязательным условием для исследования перспективных биомаркеров, связанных с патогенезом заболеваний. Недавно КР-спектроскопия привлекла внимание как многообещающая альтернатива в исследовании мРНК, хотя исторически для анализа мРНК использовались такие методы, как нозерн-блоттинг, качественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией [77-79]. Аберрантная экспрессия мРНК часто связана с различными видами рака. Методику КР использовали для дифференциации раковых и нераковых тканей на основе их профилей мРНК. Это имеет значение для раннего выявления рака и персонализированных стратегий лечения [80]. Кроме того, разработанный метод продемонстрировал полезность при обнаружении экзосомальной мРНК в образцах крови, полученных от людей, перенесших рецидив немелкоклеточного рака легких [81].

В последнее время метод КР-спектроскопии активно применяется и в области кардиологии. КР-спектроскопия позволяет идентифицировать известные биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний и способствует поиску новых. Благодаря высокой чувствительности, КР-спектроскопия может использоваться для ранней диагностики и биохимической оценки атеросклеротических поражений сосудов *in vivo*. Особый интерес представляет возможность применения КР-спектроскопии для мониторинга количества вещества из внутрисосудистых стентов, что позволит оценить клиническую эффективность их использования.

Исследования мембран тромбоцитов с помощью КР-спектроскопии выявили структурные изменения у пациентов с артериальной гипертензией [82].

Колебательная спектроскопия представляет собой мощный аналитический метод, который объединяет традиционную КР-спектроскопию с усилением сигналов, генерируемых металлическими наночастицами, такими как наночастицы серебра или золота, функционирующие в качестве подложки для SERS (Рисунок 2). Усиление сигнала комбинационного рассеяния молекул, адсорбированных на наночастицах золота или серебра (Au или Ag NPs), с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния с усилением на поверхности (SERS) может достигать $10^{10} - 10^{14}$ раз.

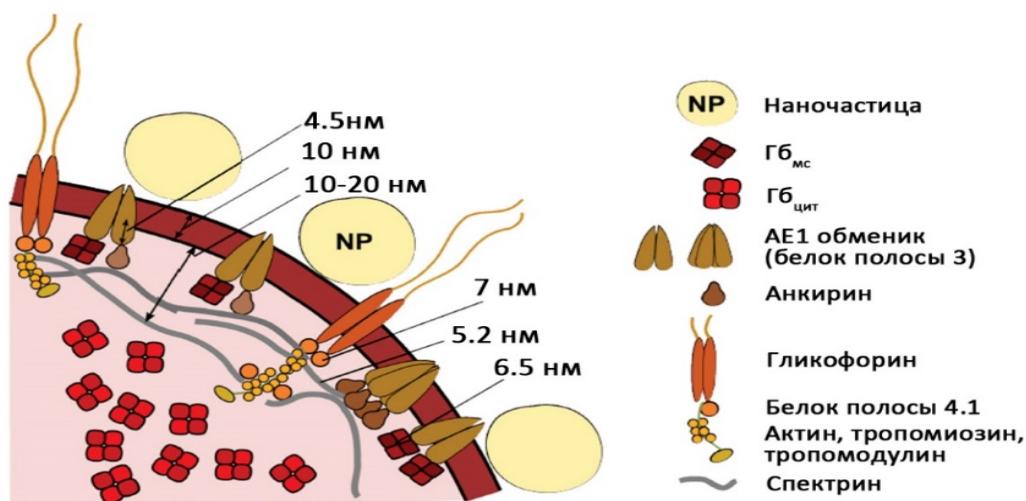


Рисунок 2. – Схема применения SERS для исследования распределения и конформации гемоглобина в эритроците. Изображение из личного архива.

SERS-анализ крови позволяет подробно исследовать структурные и конформационные изменения гемоглобина в составе нативных эритроцитов. Для эритроцитарной популяции характерно наличие двух форм гемоглобина: цитоплазматический ($\text{Гб}_{\text{цит}}$) и мембрносвязанный (Гб_{mc}) [83]. Стандартная КР-спектроскопия крови регистрирует в основном сигналы от $\text{Гб}_{\text{цит}}$, поскольку доля мембрносвязанного компонента обычно не превышает 0,5% от общего

содержания гемоглобина. При использовании SERS-спектроскопии наблюдается значительное усиление сигнала, связанного с Гб_{Мс}, связанным с плазматической мембраной клетки на расстоянии около 17 нм от серебряных наноструктур. Отметим, что их использование для усиления КР от внутриклеточных молекул обладает рядом преимуществ перед методологией нефиксированных наночастиц, поскольку при этом отсутствует индуцированное изменение конформации аналита.

SERS-методика позволяет обнаруживать следовые количества анализируемых веществ, характеризуется хорошей стабильностью и воспроизводимостью спектра, доступна по цене, не требует подготовки образцов и обеспечивает точные и быстрые результаты. Использование SERS с наночастицами серебра в качестве подложки позволило дифференцировать образцы сыворотки крови пациентов с острым инфарктом миокарда, у которых был выявлен повышенный уровень сердечного тропонина-I (cTnI), от образцов сыворотки крови здоровых людей. Анализ различий между средними спектрами образцов сыворотки крови пациентов с острым инфарктом миокарда и здоровых людей показал, что состав сыворотки крови изменяется в зависимости от развития заболевания. Различные инструменты, такие как PCA и PLSR, были применены для диагностики и различия SERS-спектров пациентов с острым инфарктом миокарда с разным уровнем сердечного тропонина-I от спектров здоровых людей. Использование SERS-спектральных данных пациентов с острым инфарктом миокарда с различными уровнями сердечного тропонина-I позволило создать модель PLSR для прогнозирования уровня тропонина-I в неизвестных/слепых образцах [84]. В 2016 с помощью КР-спектроскопии году была предложена методика идентификации миоглобина. Авторы разработали очень чувствительный сенсор для контроля молекулярной структуры и состава миоглобина, используя серебряные наночастицы и специальную подложку. Этот сенсор способен обнаруживать миоглобин в очень широком диапазоне концентраций. Установлено, что этот метод может быть полезен для диагностики инфаркта миокарда или острой почечной недостаточности у пациентов, анализируя содержание миоглобина в моче [85].

Применение метода КР-спектроскопии в кардиологии для идентификации известных биологических маркеров, таких как С-реактивный белок (СРБ), миоглобин и мозговой натрийуретический гормон (NT-proBNP), является наиболее очевидным и прямым способом его использования. Ввиду широкого применения СРБ в мониторинге сердечно-сосудистых заболеваний и системного воспаления, ведется активный поиск методов его определения с помощью КР-спектроскопии. В частности, предлагается использовать эффект поверхностного плазменного резонанса с использованием наночастиц золота. В рамках одного из таких исследований был использован «сэндвич» -анализ, при котором СРБ улавливался с помощью антител, иммобилизованных на агарозных гранулах [82].

Неинвазивные оптические методы, такие как КР-спектроскопия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса, обладают большим потенциалом для применения в клинической практике с целью персонализации антиагрегантной терапии. Эти методы характеризуются высокой скоростью и чувствительностью, не требуют сложной подготовки образцов и могут быть использованы как для определения оптимальной стратегии лечения, так и для оценки его эффективности [86].

КР-спектроскопия- уникальный метод, который нашел свое применение начиная от биомедицинских исследований до использования в реальной клинической практике [87,88]. Ранее нами был разработан метод оценки тяжести ИЛГ, позволяющий определять категорию пациентов, которым необходимо выполнение неинвазивного дообследования [89].

Методика КР-спектроскопии является уникальным подходом, который позволяет исследовать различные биологические молекулы, предоставляя ценную информацию о структурах и взаимодействиях белков, липидов, пигментов и углеводов. Возможность изучения вышеуказанных частиц на молекулярном уровне улучшает понимание физиологических процессов в человеческом организме [90-92]. Одним из главных плюсов метода является высокая чувствительность к тем веществам, которые она исследует. КР-спектроскопия может использоваться, чтобы определять относительное содержание в цельной

крови оксигемоглобина (о-Гб) или дезоксигемоглобина (д-Гб), а также дает подробную информацию о конформации и кислород-связывающих свойствах гемоглобина — способности гемоглобина связывать и выделять кислород и сродство гемоглобина к кислороду в интактных эритроцитах [93].

Важной особенностью и преимуществом КР-спектроскопии является то, что можно исследовать молекулярные изменения гемоглобина как в цельной крови и сосудах, так и суспензией эритроцитов (выделенные эритроциты).

Благодаря этой особенности спектроскопия КР позволяет анализировать свойства гемоглобина в эритроцитах в их естественном окружении из плазмы с собственным значением рН, содержанием газов, белков и белок-липидных комплексов.

Уникальной особенностью спектроскопии КР является возможность контролировать состояние гемопорфирина Гб в нативных эритроцитах и способность связывать и выделять кислород, что позволяет детально анализировать изменение в сродстве Гб к различным лигандам. Важно, что с помощью данного метода можно получать информацию о молекулярной структуре и конформационных изменениях молекул от цельной крови, что не всегда возможно при использовании других подходов, для корректной работы которых требуется разбавленная суспензия эритроцитов, и не позволяет оценить влияние плазмы на эритроциты, в то время как именно состав плазмы крови может определять изменение кислород-связывающих свойства Гб.

Другим важным преимуществом КР-спектроскопии является возможность определения относительного количества о-Гб в любой крови — венозной, артериальной или смешанной. Альтернативные методы определения степени оксигенации крови — различные методы оксиметрии — позволяют определение содержания о-Гб в артериальной крови и иногда в смешанной, но с гораздо более низкой точностью, что не отражает потребление кислорода клетками тканей.

Следующим серьезным недостатком оксиметрии является зависимость значения сигнала от состояния сосудов, скорости движения эритроцитов и

агрегации эритроцитов на стенках сосудов или друг с другом, что не позволяет корректно применять различные методы оксиметрии для регистрации количества о-Гб при патологиях сердечно-сосудистой системы или воздействиях, изменяющих состояние сосудов, которые могут возникнуть при воздействии наночастиц. Подобные недостатки в значительной степени перекрывают главное достоинство различных методов оксиметрии — возможность работы *in vivo*.

Спектроскопия КР гемоглобина была успешно использована для анализа свойств гемоглобина крови здоровых доноров и пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, диабетом, космонавтов после длительного космического полета [94, 95, 96, 97, 98, 99, 100]. Также спектроскопия КР успешно применяется в экспериментах по модификации свойств эритроцитов условиях *in vitro* [101].

Итак, данный метод характеризуется рядом преимуществ, в том числе неинвазивностью, безопасностью, оперативностью и высокой чувствительностью. Несмотря на наличие некоторых ограничений, прогресс в области технологий и усовершенствование методов анализа данных открывает новые перспективы для использования КР-спектроскопии в различных сферах медицины.

1.3.2. Спектроскопия КР гемоглобина эритроцита

Кровь — это жидкая ткань организма, которая жизненно необходима для его функционирования. Основная функция крови заключается в переносе кислорода из легких ко всем тканям и клеткам организма и перемещении углекислого газа в обратном направлении. Измерение уровня кислорода и питательных веществ крови часто используется для клинической оценки здоровья человека.

Гемоглобин составляет > 95% сухого веса эритроцитов и является удобным объектом для применения комбинационного рассеяния при исследовании конформации как глобина, так и гема. В спектрах КР как эритроцитов, так и цельной крови выявлены полосы характеризующие колебания отдельных связей

молекул гемоглобина. Очевидно, что исследование изменений связи Fe-O₂ в гемопорфирине гемоглобина важно для выяснения механизма переноса кислорода эритроцитами, и это стало предметом многих исследований. Известно, что атом железа в оксигемоглобине существует в состоянии с низким содержанием железа (Fe^{3+}), а не в состоянии (Fe^{2+}).

Спектры КР гема позволяют контролировать локализацию атома железа в плоскости гемапорфиринового цикла, а также выявить наличие лигандов в молекуле Гб за счет изменения конформации макроцикла, что является важным для оценки кислород-транспортной функции крови. С помощью этого метода оценивают состояние гемопорфирина — гема молекулы гемоглобина в нативных эритроцитах по изменению конформации связей порфиринового макроцикла гемоглобина.

Для оценки конформационного состояния гема гемоглобина используются специальные методы обработки спектров КР, которые дают нам возможность изучить конформацию д-Гб и конформацию о-Гб, а также способность связывать и сбрасывать кислород. Этот подход важен для контроля за изменениями способности гемоглобина в эритроцитах переносить кислород и, соответственно, характеризовать наличие или развитие гипоксии в тканях больного.

Молекула гемоглобина состоит из связанных между собой четырех белковых субдоменов каждый из которых содержит простетическую группу — молекулу гемопорфирина (Рисунок 3). Известно, что интенсивность и положение полос в спектрах КР гемоглобина, как изолированного, так и в эритроцитах, зависит от конформации гемопорфирина, в частности, от степени окисления и спинового состояния атома железа в геме [102, 103].

При определенных условиях КР спектр эритроцитов представляет суперпозицию полос от молекул гемоглобина, находящихся в различных конформационных состояниях (чаще молекулы гемоглобина в о-Гб и д-Гб). Для оценки конформации порфиринового кольца использовали анализ изменений величины интенсивности полос ν_4 и ν_{19} КР спектра (Рисунок 4). Известно, что

окисление д-Гб приводит к сдвигу указанных полос в длинноволновую область спектра, что позволяет различить окси- и деокси- формы гемоглобина [104]. Используя отношения вида: интенсивность полосы КР-пика, характерного для оГб, I_{oxi} , деленного на сумму интенсивностей полос в окси и дезоксиформе ($I_{\text{oxi}} + I_{\text{deoxi}}$) этого же пика, становится возможным, при определенных манипуляциях, оценить такой клинический параметр, как насыщенность гемоглобина кислородом (долю оксигемоглобина в крови), sO_2 .

Амплитуда полосы КР - спектра $v4$, обусловлена симметричными колебаниями колец пирролов и меняется при окислении атома Fe^{2+} до Fe^{3+} или в случае присоединения лиганда (например, кислорода) к атому железа. В молекуле оксигемоглобина кислород «оттягивает» на себя пару электронов от атома железа и в спектре КР наблюдается смещение полосы КР-спектра до 1375 см^{-1} . Амплитуда пиков 1552 и 1588 см^{-1} КР- спектра зависит от колебаний в связях метиновых мостиков пиррольных колец порфирина, которые в свою очередь, зависят от спинового состояния атома железа гема [105]. В этом случае, в спектре КР гемоглобина будет более выражен пик 1552 см^{-1} (Рисунок 4). В случае присоединения любого лиганда, атом железа переходит в низкospиновое состояние и меняет свою локализацию, ближе к плоскости порфиринового кольца. В результате молекула гема становится более «компактной», а в спектре КР будет более выражен пик 1588 см^{-1} . Вероятно, что подобное изменение конформации гемопорфирина может осуществляться не только из-за взаимодействия с лигандом, но и на фоне конформационных изменений в молекуле глобина или всего гема, приводящих к связыванию кислорода с другими сайтами гемоглобина.

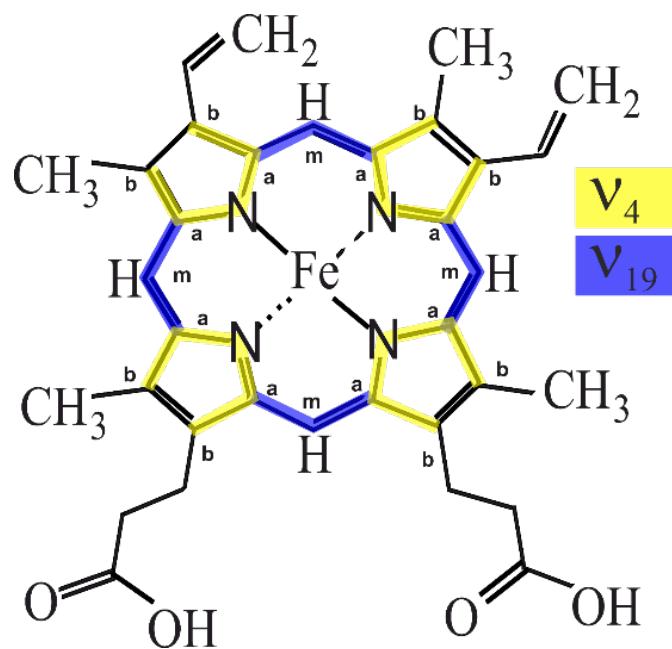


Рисунок 3. – Структурная формула простетической группы гемоглобина - гемопорфирина с нумерацией атомов. Цветом отмечены молекулярные связи, колебания которых влияют на полосы v_4 (желтый), v_{19} (синий). Из личного архива.

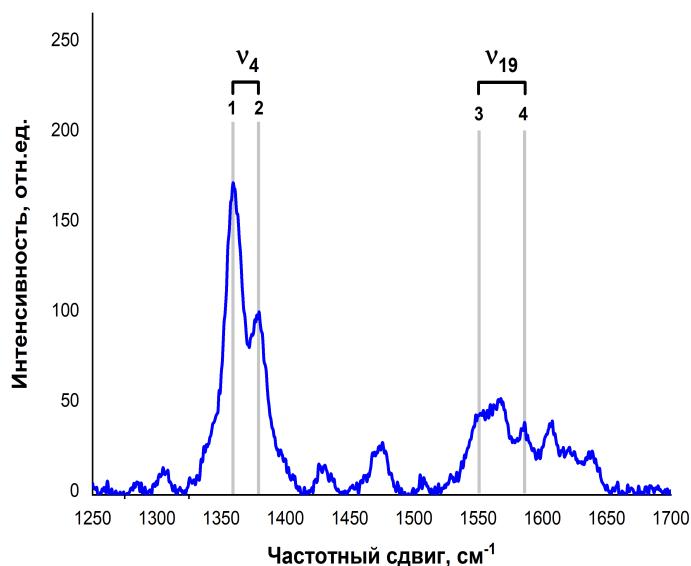


Рисунок 4. – Характерный КР-спектр крови. Положение v_4 (1,2) и v_{19} (3,4) соответствуют пикам с положением 1355 см^{-1} , 1375 см^{-1} и 1552 см^{-1} и 1588 см^{-1} , соответственно. Из личного архива.

Анализ соотношений величин интенсивности этих пиков, можно оценить вклад простетической группы гемоглобина в процессе связывания молекулы кислорода кислород — I_{1355}/I_{1552} . Это отношение пиков КР-спектра, характерных для дГб (поскольку эта конформация гемопорфирина характерна для состояния при связывании кислорода), причем один изменяется при присоединении лиганда (1355 см^{-1}), а второй отражает происходящие в геме структурные изменения (1552 см^{-1}), что позволяет учитывать эффект связывания кислорода и отделить его от структурных изменений, происходящих в молекуле.

Таким образом, целью нашей работы было, с помощью КР-спектроскопии, исследовать роль конформации гемоглобина в кислород-транспортной функции крови у пациентов с идиопатической легочной гипертензией, в кубитальной вене здоровых людей и пациентов с идиопатической легочной гипертензией, оценки вклада изменений конформации гемопорфирина гемоглобина в реализации кислород-транспортной функции эритроцитов венозной крови, а также выявления характера взаимоотношений между параметрами крови и конформации гемопорфирина гемоглобина в эритроцитах больных.

1.4 Подходы к лечению пациентов с ИЛГ

1.4.1. Современная ЛАГ-терапия в российской практике

Для успешного лечения пациентов с ИЛГ необходимо учитывать три ключевых положения; соблюдение общих мероприятий, выбор стартовой стратегии ЛАГ специфической терапии, назначение комбинированной ЛАГ специфической терапии.

Современной ЛАГ-специфическая терапия должна улучшать выживаемость пациентов с ЛГ путем достижения низкого профиля риска смертности (<5% в год). Лечение данной нозологии требует многостороннего взгляда и строгого соблюдения алгоритмов диагностики и лечения, в конечном итоге это открывает

новые горизонты для пациентов и дает надежду на позитивные результаты при правильном подходе.

Терапия, направленная на ключевые патогенетические пути легочной артериальной гипертензии, воздействует сразу на три главные мишени: активацию системы эндотелина-1; недостаточность эндогенных вазодилатирующих и противовоспалительных факторов (таких как простациклин и оксид азота) [1,3,6]. К современным классам лекарственных средств относят антагонисты рецепторов эндотелина (бозентан, амбрисентан, мацитентан), аналоги простациклина (илопрост), агонисты рецепторов простациклина (селексипаг), ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (сildenafil), а также стимуляторы растворимой гуанилатциклазы (риоцигуат) [1,3].

АРЭ обладают длительным вазоконстриктивным эффектом, при связывании с рецепторами типа А (ЭТА), в тоже время влияет на рецепторы типа В (ЭТВ) эндотелиальных клеток за счет усиления клиренса в лёгких и посредством увеличения продукции NO и простациклина стимулирует вазодилатацию [1,3,6]. Ингибиторы фосфодиэстеразы 5 подавляют действие фосфодиэстеразы 5-го типа, у пациентов с ЛАГ значительно повышен уровень фосфодиэстеразы 5-го типа – ферmenta, осуществляющего деградацию вторичного мессенджера NO – циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), таким образом препараты данного класса предотвращают деградацию цГМФ [3,6].

Стимуляторы растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) повышают продукцию цГМФ, оказывая как прямое стимулирующее действие на рГЦ, так и повышая чувствительность ферmenta к NO [3,6]. Агонисты рецепторов ПЦ – высокоселективно активирует IP-рецепторы [3,6]. Простаноиды- аналоги простациклина восполняют его дефицит. Эффекты ПЦ реализуются через активацию рецепторов ПЦ (IP) за счет увеличения продукции циклического аденоzinмонофосфата [3,6].

Отдельно отметим актуальность и эффективность назначении блокаторов кальциевых каналов (БКК). Назначение данной медикаментозной в максимально переносимых дозировках допустимо только при наличии положительной ОФП.

Преимущественное используются амлодипин или нифедипин, если отмечается склонность к синусовой тахикардии, предпочтение отдается дилтиазему [3,6].

1.4.2. Первый агонист простациклических рецепторов- Селексипаг

В связи с этим подробно рассмотрим роль селективных агонистов рецепторов простациклина – селексипаг. Данный препарат был включен в терапию ЛАГ недавно, однако уже занял важную нишу. Селексипаг применяется как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами, что позволяет индивидуализировать лечение в зависимости от состояния пациента [6]. Основное действие селексипага, а также его метаболита реализуется через активацию IP₂ рецепторов, вызывая вазодилатацию в легочных сосудах, а также снижения ЛСС.

В РКИ 3-й фазы GRIPHON с участием 1156 пациентов (среди них группа селексипага - 574 пациента) применение селексипагом в качестве монотерапии или комбинированная терапия (двойная и даже тройная) с использованием селексипага снижала время до наступления первого события, ассоциированного с ЛАГ, или смерти пациента на 40% (ОР = 0,60; 99% ДИ 0,46 - 0,78; $p < 0,001$) [106].

Стартовая терапия начинается с 200 мкг два раза в день с достижением максимально переносимой дозы 1600 мкг 2 раза в день в течение каждой недели. В РКИ GRIPHON 42,9% пациентов получали высокие дозы (1200-1600 мкг 2 раза), 31,2% – средние и 23,2% – низкие (200-400 мкг 2 раза) [3,6,107].

Наиболее распространенными побочными эффектами на фоне приема селексипага были головная боль, боли в нижней челюсти, тошнота, диарея, миалгии, приливы. Совместный прием селексипага с ингибитором CYP2C8 гемфиброзилом категорически противопоказан из-за двукратного увеличения концентрации селексипага в крови и, соответственно, усиления побочных эффектов [107].

1.4.3. Место комбинированной терапии в реальной практике

Для достижения наилучшего клинического эффекта пациентам с ЛАГ назначаются совместные препараты для воздействия на несколько путей патогенеза, тем самым достигая синергизма. В настоящий момент можно смело утверждать, о высокой эффективности комбинаций специфических препаратов ЛАГ. В таблице суммированы ключевые регистрационные исследования по изучению эффективности и переносимости ЛАГ-специфической терапии, доказавшие возможность применения препаратов в виде моно-, послед и стартовой комбинированной терапии (Таблица 1).

Таблица 1. – Рандомизированные клинические исследования у больных ЛАГ с применением комбинированной терапии.

Препарат	Исследование	Предшествующая терапия	n больных	Длительность	Первичная конечная точка	Вторичные конечные точки
Амбризентан	AMBITION [108]	Отсутствие терапии	500	24 недели	Время до клинического ухудшения, клиническая неэффективность терапии	Д6МХ ФК (ВОЗ) NT-proBNP/BNP
Бозентан	EARLY [109]	Отсутствие терапии или силденафил (16%)	185	24 недели	ЛСС, Д6МХ	Время до развития клинического ухудшения
Мацитентан	SERAPHIN [110]	Илопрост инг./силденафил	742	100 нед.	Время до развития клинического ухудшения	Безопасность
Илопрост	STEP [111]	Бозентан	67	12 недель	Д6МХ	Время до развития клинического ухудшения
	COMBI [112]	Бозентан	40	12 недель	Д6МХ	ФК (ВОЗ) (НД), VO ₂ peak при СВЭМ (НД), время до (НД)

Продолжение таблицы 1. – Рандомизированные клинические исследования у больных ЛАГ с применением комбинированной терапии.

Препарат	Исследование	Предшествующая терапия	n больных	Длительность	Первичная конечная точка	Вторичные конечные точки
Силденафил	COMPASS-2 [113]	Бозентан (n=159). Плацебо (n=175)	334	16 недель	Время до развития клинического ухудшения (НД)	Д6МХ * ФК (ВОЗ) * NT-proBNP/BNP *
Тадалафил	PHIRST [114]	Отсутствие терапии или бозентан (53%)	405	16 недель	Дистанция в teste 6МХ	Время до развития клинического ухудшения
	TRITON [115]	Отсутствие терапии	250	26 недель	ЛСС (НД)	Д6МХ (НД) ФК (ВОЗ) NT-proBNP/BNP Время до развития клинического ухудшения *
	DUE [116]	Отсутствие терапии или монотерапия ИФДЭ5 или АРЭ	187	24 недели	ЛСС	Д6МХ (НД) ФК (ВОЗ) NT-proBNP/BNP Время до развития клинического ухудшения
Риоцигуат	PATENT-1 [117]	АРЭ [44% больных] или непарентеральные простаноидами [6% больных])	380	12 недель	Д6МХ	Время до развития клинического ухудшения ФК (ВОЗ) Индекс одышки по шкале Борга NT-proBNP/BNP Гемодинамические параметры
Селексипаг	GRIPHON [107]	Отсутствие терапии, прием ИФДЭ5 и/или или АРЭ в теч. 3 мес.	1156	71 неделя	Время до развития клинического ухудшения	ФК (ВОЗ) NT-proBNP/BNP

Заключение

Изучение молекулярных механизмов развития легочной гипертензии по сей день является актуальной проблематикой. Новым подходом в диагностике и терапии данного заболевания является метод КР- спектроскопии, позволяющий выявить особенности молекулярной организации гемоглобина при осуществлении кислород-транспортной функции крови. В ходе различных научных исследований данный метод нашел свое применение в различных сферах медицины, укрепив свои позиции за счет своей чувствительности и информативности.

Таким образом, учитывая особенности патофизиологии ЛАГ, представляется перспективным изучить особенностей кислород-транспортной функции крови у этой категории больных.

Данное исследование нацелено на использование КР- спектроскопии у пациентов с ИЛГ для оценки особенностей конформации гемоглобина, сравнение различий в кислород-транспортной функции крови между ИЛГ и ЛАГ-СДД, оценки эффективности ЛАГ-специфической терапии, а также создание методики, позволяющая оценивать тяжесть течения ЛГ.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Общая характеристика

Диссертационная работа выполнена на базе отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России. Для верификации диагноза ИЛГ и ЛАГ-ССД и проведения контрольных визитов для оценки эффективности терапии селексипагом все больные госпитализировались в отдел легочной гипертензии и заболеваний сердца. Тема исследования, предмет, материал и методы исследования обсуждены и одобрены на заседании независимого этического комитета клинических исследований ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России (протокол № 83 заседания Комитета от 31 октября 2022г.).

В рамках диагностического поиска при подозрении на ЛАГ проводилось полноценное обследование, стартовавшего со сбора амnestических данных, углубленного физикального осмотра и анализа биохимических и иммунологических исследований крови, включая маркеры гемостаза и аутоиммунные антитела. Далее в протоколе были предусмотрены инструментальные подходы: ЭКГ, обзорная рентгенография грудной клетки, эхокардиография, спирометрия. Перфузионная сцинтиграфия проводилась с целью исключения тромбоэмбологических процессов в легких. Неотъемлемой частью обследования являлось выполнение инвазивной катетеризации правых отделов сердца, необходимая для точного определения легочной гемодинамики, а также проведение острых вазореактивных проб в группе пациентов с ИЛГ.

Образцы крови, необходимые для исследования отбирались у пациентов, которые были госпитализированы в отдел легочной гипертензии и заболеваний сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии», кровь «здоровых добровольцев» была доставлена из ГНЦ «Институт медико-биологических проблем». Кровь пациентов доставлялась в

пробирке с гепарином, в холодильнике со льдом и исследовали в течение 3 часов при комнатной температуре.

Критериями включения в исследование являлись:

- возраст старше 18 лет,
- верифицированный диагноз ИЛГ (для исследуемой группы) или ЛАГ на фоне системной склеродермии (для группы сравнения),
- отсутствие ЛАГ-специфической терапии или стабильное течение ЛАГ, позволяющее осуществить отмену специфической терапии сроком на 5-7 дней (за исключением больных в группе селексипага),
- подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями невключения в исследование являлись:

- ЛГ установленной этиологии (группы 2-5 или др. ассоциированные формы ЛАГ),
- врожденные и приобретенные пороки сердца,
- заболевания опорно-двигательного аппарата, препятствующие проведению теста 6-минутной ходьбы,
- цереброваскулярные заболевания (например, преходящее нарушение мозгового кровообращения, инсульт) в течение предшествующих 6 месяцев,
- отказ от КПОС,
- несоблюдение методов контрацепции женщинами детородного возраста.

Для группы лечения селексипагом:

- печеночная недостаточность средней и тяжелой степени тяжести, тяжелая ХПН,
- беременность, лактация,
- артериальная гипертония,
- ишемическая болезнь сердца, подтвержденная по данным МСКТ коронарных артерий или коронарной ангиографии,

- тяжелая декомпенсация сердечной недостаточности,
- тяжелые нарушения сердечного ритма.

2.2. Дизайн исследования

Всего скринировано 102 пациента с ЛАГ, согласно критериям включения/невключения в исследование было включено 83 пациента с ЛАГ, включающие 63 пациента с ИЛГ и 20 пациентов с ЛАГ-ССД соответственно. Группа контроля составила 10 «здоровых добровольца» (Рисунок 5). У всех пациентов было зафиксировано $\text{ср.ДЛА} \geq 25$ мм рт.ст., выявлены критерии ЛАГ, у больных ИЛГ проведена пробы на вазореактивность.

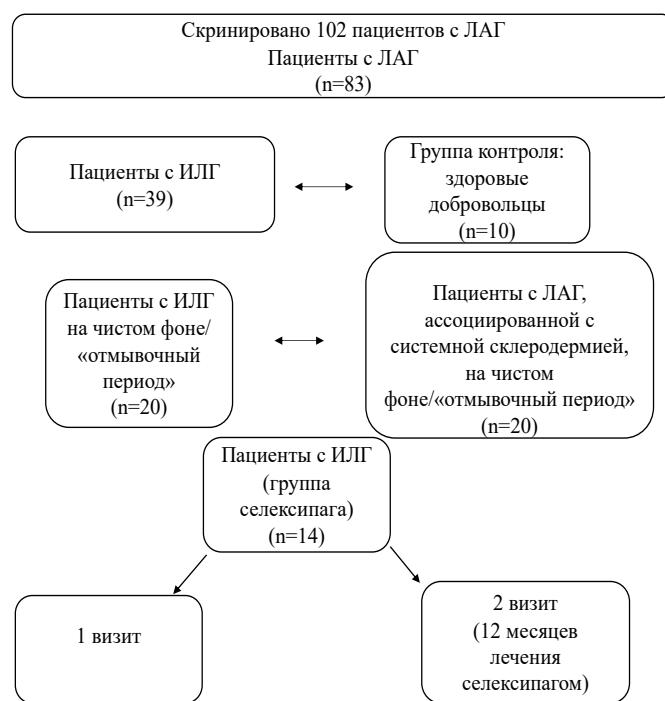


Рисунок 5. – Дизайн исследования.

В данной исследовательской работе было проведено 4 серии исследования. В первую серию исследования вошла группа из 39 пациентов с впервые установленной ИЛГ с функциональным классом I (ВОЗ) – 2 пациентов, II – 13 пациентов, III – 22 пациентов, IV – 2 пациента. Из них 15 пациентов ранее не

получали ЛАГ-специфическую терапию. У 24 больного проводился «отмывочный» период пробной терапии в течение 5-7 дней. Группу контроля составили 10 здоровых добровольцев. В данной серии исследования с помощью КР-спектроскопии оценивалась кислород-транспортная функция крови у пациентов с ИЛГ и группой «здоровых добровольцев» путем забора крови из кубитальной вены. Оценивались параметры спектров, как цельной крови, так и суспензии эритроцитов.

Во второй серии исследования было отобрано две группы: 20 пациентов с установленным диагнозом ИЛГ и 20 пациентов с установленным диагнозом ЛАГ-ССД. В данном исследовании с помощью методики КР спектроскопии мы контролировали особенности кислород-транспортной функции между двумя группами заболевания.

В третий серии исследования было включено 14 пациентов с диагнозом ИЛГ, находившихся на комбинированной ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг. Диагноз устанавливался в соответствии с алгоритмом, предложенным в российских рекомендациях по диагностике и лечению ЛГ (2020г.). Всем участникам исследования проведен сравнительный анализ клинических, гемодинамических параметров, в том числе проводилась оценка конформации гемоглобина с помощью КР-спектроскопии. В данной серии экспериментов с помощью КР-спектроскопии оценивалась эффективность ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг, на основании данных комплексного обследования и оценки кислород-транспортной функции у пациентов с ИЛГ методом КР-спектроскопии.

В четвертой серии исследования нами была разработана методика оценки степени тяжести у пациентов с ИЛГ с помощью метода КР-спектроскопии. В исследовании принимали участие 10 пациентов, которые наблюдались в отделе ЛГ и заболеваний сердца с подозрением на ИЛГ, им была проведена КПОС с целью подтверждения диагноза.

2.3. Методы обследования

2.3.1. Отбор крови

Отбор крови из кубитальной вены производился в вакуумные пробирки, содержащие гепарин (20-50 Ед/мл крови). Также мы оценивали различные параметры клинической и биохимической крови. После забора, кровь хранили при $t = +4^{\circ}\text{C}$.

В данной работе при подготовке образцов применяли специально подобранные растворы. Основную буферную систему (буфер Аллена) формировали, точно рассчитывая состав для каждого 100 мл: содержали 145 mM NaCl (841 мг), 5 mM KCl (37 мг), 1 mM CaCl₂ (110 мкл 10% раствора), 4 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ (12 мг), а также 5 mM глюкозы (180 мг), при этом pH поддерживали на уровне 7,4. Для растворения эритроцитов в процессе гемолиза использовали среду, включающую 4 mM Na₂HPO₄ и 1 mM NaH₂PO₄, pH которой корректировали до 7,4 с помощью сильных растворов NaOH или HCl, pH подтверждали с помощью лабораторного прибора (рН-метр pH410). При необходимости приготовления 1 M раствора NaOH растворяли 4 г вещества в 100 мл воды. Пропорции для 1 M раствора HCl составляли: 17,2 мл 36%-го концентрата на 100 мл итогового объема, тщательно перемешивая компоненты. Для очистки эритроцитов от других форменных элементов и плазмы кровь трижды промывали буфером Аллена (в соотношении 1:3), каждый раз центрифугировали в приборе Laborfuge 400R по 5 минут при $+4^{\circ}\text{C}$ с ускорением 1500g. Надосадочную жидкость отделяли, процедуру промывки дублировали дважды в идентичных условиях для достижения высокой степени чистоты клеточной взвеси.

2.3.2. Метод спектроскопии КР

В данной работе использовали область спектра КР гемоглобина, характеризующими структуру и конформацию гемопорфирина гемоглобина

(Рисунок 6). Спектр КР эритроцита полностью соответствует спектру различных типов Гб, присутствующих в крови [118]. Метод КР-спектроскопии использовали для исследования динамики молекулярной структуры гема (винильных групп порфиринового макроцикла) и глобина гемоглобина в эритроцитах в норме и при патологии. Кроме того, он был полезен для оценки динамики гемоглобина при патологии, так как позволяет оценить конформационные изменения гема и глобина одновременно. Кроме того, КР-спектроскопия имеет заметные преимущества в области диагностики аномального гемоглобина, определения насыщения гемоглобина кислородом и анализа метгемоглобина в крови.

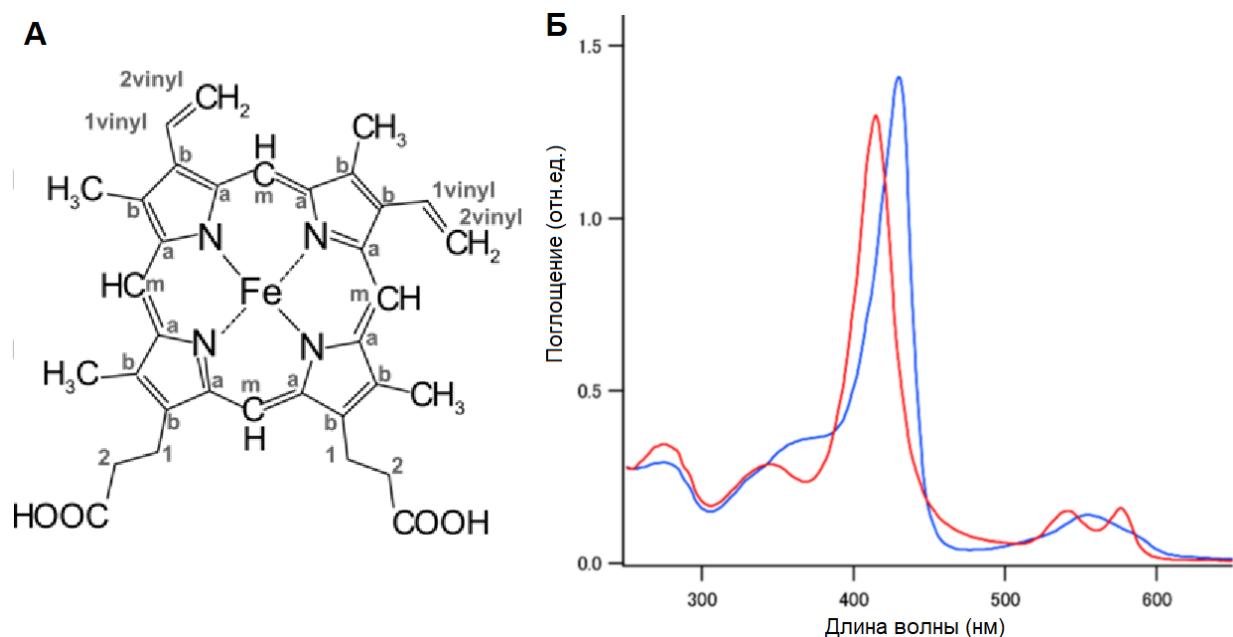


Рисунок 6. – А Молекула гемопорфирина гемоглобина, Б — спектр поглощения оксигемоглобина (красный) и дезоксигемоглобина (синий). Рисунок адаптирован из [118].

В Таблице 2 указаны положения основных полос спектра КР и характеристика факторов, оказывающих влияние на положение полос спектра КР.

Таблица 2. – Частотный сдвиг молекул в спектре КР гемопорфирина гемоглобина.

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Факторы, влияющие на частотный сдвиг в КР-спектре	Локализация молекулярного события в Гб
1127	Изменения восстановленного железа (Fe^{2+}), приводящее к изменению конформации гема	оксигемоглобин
1355	Редокс состояние Fe^{2+} , при ассоциации с молекулой кислорода	дезоксигемоглобин
1375	Степень восстановления Fe^{2+} , сцепление с лигандом	оксигемоглобин
1550	Изменения спина атома Fe^{3+} , приводящие к новой конформации глобина	дезоксигемоглобин
1580-1588	Изменения спина атома Fe^{3+} , соответствующее модификациям размера молекулы гемопорфирина	окигемоглобин

В Таблице 3 представлены соотношения интенсивностей полос спектра КР гемоглобина и их характеристика. Для оценки изменений клада определенных связей молекулы и, соответственно, ее конформации используют не величину интенсивности отдельных колебаний (полоса КР спектра), а соотношение определенных полос КР спектра, так как это более информативно, а также уменьшает ошибку при представлении результатов (так как параметр величина интенсивности полос КР-спектра может меняться в зависимости от условий эксперимента).

Измерения КР проводились на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия) на базе микроскопа Olympus

IX, объектив 5x, лазер 532 нм, центрифуга Laborfuge 400R (Thermo Scientific, США).

Таблица 3. – Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [119].

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1375}/I_{1172}	Величина отношения, пропорциональная вкладу пиррольных колец молекулы гема в изменениях конформации гемопорфирина, что косвенно характеризует вклад коформации гема оксигемоглобина.
I_{1580}/I_{1375}	Величина отношения, пропорциональная вкладу колебаний винильных групп и симметричных движений пиррольных колец. Рост данного параметра коррелирует с увеличением вероятности нахождения гема гемоглобина в комплексе с лигандами, особенно кислорода.

Продолжение Таблицы 3. – Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [119].

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	Величина отношения, пропорциональная вероятности нахождения гема гемоглобина в форме характерной для гема оксигемоглобина.
I_{1580}/I_{1550}	Величина отношения, пропорциональная вкладу колебаний метиновых мостиков между пирролами гемопорфирина. Более высокое значение коррелирует с вероятностью формирования комплекса гемоглобина с лигандами (в частности кислородом) в виде «плоской» конформации гема.
I_{2880}/I_{2930}	Величина отношения, пропорциональная вкладу метильных групп аминокислотных остатков белка глобина, что свидетельствует об изменении конформации глобина гемоглобина.

Фоновую флуоресценцию устранили путем вычитания базовой линии, после чего определяли интенсивность полос спектра КР с использованием оригинальной программы Origin. Базовую линию получали при помощи кубического сплайна. Для повышения чувствительности метода использовали модификацию КР - SERS и коллоидные частицы серебра.

2.3.3 Лабораторно-инструментальные методы исследования

Исследование уровня NT-pro-BNP в плазме крови

В целях включения пациентов в исследование забор венозной крови производился для каждого участника. Определение исследуемого маркера осуществлялось посредством специализированного автоматического анализатора, используя реагенты из наборов «Elecys NT-proBNP». Такая технология обеспечивала строгую стандартизацию процесса и высокую точность результатов даже при большом объеме выборки.

2.3.4. Инструментальные методы исследования

Трансторакальная эхокардиография

Кардиовизуализация осуществлялась при помощи сложной ультразвуковой системы экспертного класса «Vivid E9» (GE Healthcare), укомплектованной электронным датчиком M5S-D. Для многоплановой оценки функционального состояния сердца применяли комбинацию двухмерных режимов, цветовое доплеровское картирование и фазовый анализ, позволяя описывать спектр внутрисердечных и легочных трансформаций при легочной гипертензии. Каждый исследуемый параметр выстраивался в контекст индивидуальной картины заболевания для объективной стратификации выраженности ЛГ.

Тест 6-минутной ходьбы

Оценка переносимости субмаксимальной физической нагрузки проводилась посредством шестиминутного пробы на заранее размеченном маршруте в 50 метров, организованного в утренние часы. Основная задача пациента — пройти в спокойном, собственном темпе максимально возможное расстояние за фиксированный период в шесть минут, при этом в случае появления признаков дискомфорта он имел право как снизить темп, так и временно остановиться для

восстановления. До и после теста дополнительно фиксировались кардиореспираторные параметры: частота сердечных сокращений, сатурация кислорода (SpO_2), а также — количественно и пошагово — степень одышки по модифицированной шкале Борга (от полного отсутствия до «крайней, максимальной» выраженности). Функциональный резерв больного ранжировался в соответствии с адаптированной классификацией Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

Катетеризация правых отделов сердца

Для проведения КПОС использовался аппарат Allura Xper FD10 (Philips, Нидерланды), что обеспечивало возможность прямой регистрации гемодинамических параметров, а также — путем оксиметрии — мониторинг насыщения венозной крови кислородом, завершая комплексную гемодинамическую оценку пациента.

2.4 Статистическая обработка результатов

Анализ статистических данных проводился при помощи программы GraphPad Prism, версия 10.1 для Windows. Статистическую значимость различий в группах оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни или с использованием критерия Вилкоксона ($p<0,05$). При обработке непрерывных параметров близких к нормальному распределению использовали расчёт среднего арифметического (M) с соответствующим стандартным отклонением ($\pm SD$). Для описания данных с выраженным отклонением от нормальной статистики рассчитывали медиану (Me), а также интервалы межквартильного размаха: 25-й и 75-й перцентили [Q_1-Q_3], отражающие ключевые статистические тенденции распределения выборки.

Глава 3. Результаты

3.1. Особенности конформации гемопорфирина гемоглобина в крови из кубитальной вены и сусpenзии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и здоровых добровольцев

3.1.1. Экспериментальные и клинико-гемодинамические особенности проведения исследования по оценке конформации гемопорфирина и глобина гемоглобина методом КР-спектроскопии

В рамках исследования были сформированы две когорты пациентов: первая включала 10 здоровых добровольцев, вторая- 39 пациентов с установленным диагнозом ИЛГ, не получавшие ЛАГ-терапию, либо находившиеся на «отмывочном периоде» в течение 5-7 дней.

У всех участников исследования проводился забор крови из кубитальной вены для исследования конформации гемоглобина эритроцитов как в цельной крови, так и в выделенных эритроцитах (см. главу Материалы и Методы) цельной крови. Для повышения чувствительности метода, использовали модификацию метода КР, вариант - гигантское комбинационное рассеяние с использованием серебряных наноструктур (см. главу Материалы и Методы) [120]. В качестве здоровых добровольцев было включено 10 пациентов в возрасте от 35 до 50 лет. Обработанные данные клинико-гемодинамических характеристик пациентов представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, разброс параметров (Таблица 4).

Таблица 4. – Клинико-гемодинамическая характеристика пациентов с ИЛГ на момент включения в исследование.

Показатель	Медиана	Квартиль
Д6МХ, м	405	[330; 505]

Продолжение таблицы 4. – Клинико-гемодинамическая характеристика пациентов с ИЛГ на момент включения в исследование.

Показатель	Медиана	Квартиль
одышки по Боргу, баллов	5	[3; 5]
ЭхоКГ: СДЛА, мм рт.ст.	90	[80; 100]
ЭхоКГ: S ПП, см ²	24	[20; 32]
КПОС: срДЛА,	61	[52; 67]
КПОС: ЛСС, дин*сек/см ²	1153	[862; 1629]
КПОС: ДЗЛА, мм рт. ст	7	[5; 11]
КПОС: СИ, л/мин*м ²	1,9	[1,5; 2,6]
КПОС, SvO ₂ , %	62	[55; 65]

Данные опубликованы в [120]. Примечание – данные представлены как Me [25%; 75 %], Д6МХ-дистанция 6 минутной ходьбы, ЭхоКГ-эхокардиография, СДЛА-sistолическое давление легочной артерии, S ПП- площадь правого предсердия, КПОС- катетеризация правых отделов сердца, ср.ДЛА- среднее давление легочной артерии, ЛСС- легочное сосудистое сопротивление, ДЗЛА- давление заклинивания легочной артерии, СИ- сердечный индекс, SvO₂- насыщенность крови кислородом

3.1.2. Особенности конформации гема и глобина эритроцитов крови пациентов с ИЛГ

«В данной серии экспериментов были выявлены существенные различия в КР-спектрах цельной крови между пациентами с ИЛГ и контрольной группой. У пациентов с ИЛГ, в КР-спектре наблюдаются большие величины интенсивности полос при 1355, 1550, 1600 см⁻¹, что, вероятно, обусловлено конформационными изменениями порфиринового макроцикла гема гемоглобина. Наоборот, величина интенсивности полос КР- спектра в диапазоне 2800–3000 см⁻¹, связанных с

валентными колебаниями аминокислот глобина, у пациентов с ИЛГ снижена (Рисунок 7).

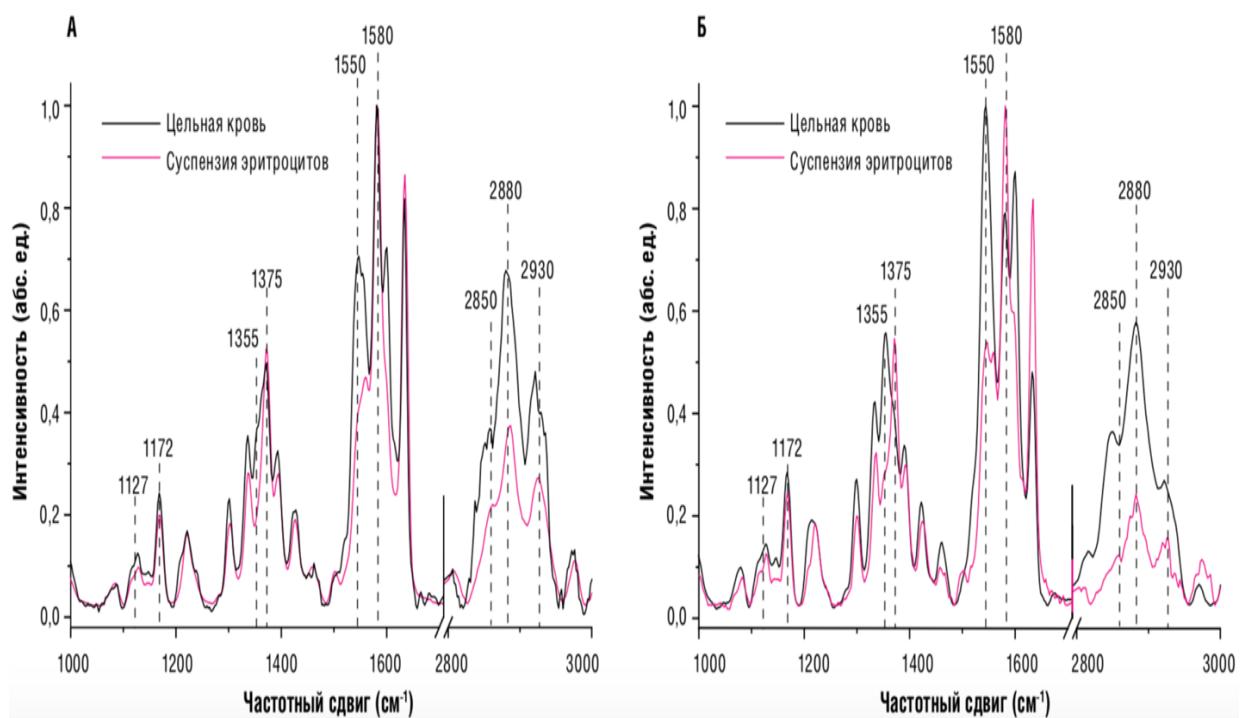


Рисунок 7. – КР-спектр здорового добровольца (контроль) (А) и пациента с ИЛГ (Б) для цельной крови (черная кривая) и суспензии эритроцитов (красная кривая) [120].

Для выделенных эритроцитов (СЭ) обнаружена аналогичная зависимость, как и для цельной крови пациентов с ИЛГ. Действительно, интенсивность полос КР-спектра при 1355 и 1550 см^{-1} , характерных для молекулы гема, увеличиваются, а интенсивность характерных полос КР-спектра аминокислот глобина уменьшается, что соответствует особенностям изменения конформации глобина у больных. Такая зависимость подтверждает конформационные изменения гема и аминокислотного состава глобина у пациентов с ИЛГ» [120].

Установлено, что у пациентов с ИЛГ (по сравнению с контролем) гем внутриклеточного Гб эритроцитов с большей вероятностью находился в состоянии

дезоксиформы, а выявленные изменения конформации были следствием изменения конформации порфиринового макроцикла гемопорфирина (Рисунок 8).

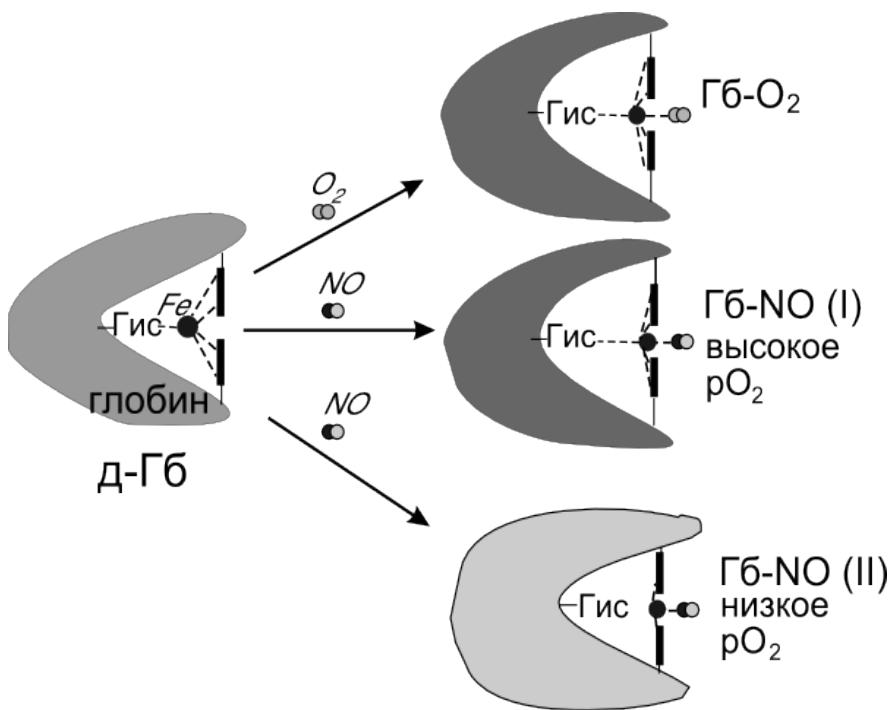


Рисунок 8. – Схема комплексов гема гемоглобина, д-Гб – дезоксигемоглобин; о-Гб – оксигемоглобин; Показано расположение атома железа (Fe) и плоскости порфиринового макроцикла по отношению к молекуле кислорода (O_2) и оксида азота (NO). Изображение из личного архива.

При исследовании конформации гемоглобина как в цельной крови, так и в эритроцитах группы «здоровых добровольцев» и пациентов с ИЛГ выявлены изменения в конформации пиррольных колец гема отношение $(I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375}))$ характерное для гемоглобина в состоянии дезоксигемоглобина. Также обнаружены особенности, характеризующие колебания боковых -CH₃ радикалов (I_{1375}/I_{1172}) (Рисунок 9). Существенных различий в конформации пиррольных колец гемоглобина, включая способность выделять лиганды (I_{1580}/I_{1375}) , которые были обнаружены в СЭ, в цельной крови у пациентов с ИЛГ и здоровыми добровольцами не обнаружено. Представленные данные подтверждают

предположение о том, что изменения гема гемоглобина при патологии затрагивают боковые радикалы и конфигурацию кольца гема, но не формируют выраженных различий в его способности связывать и выделять кислород [120].

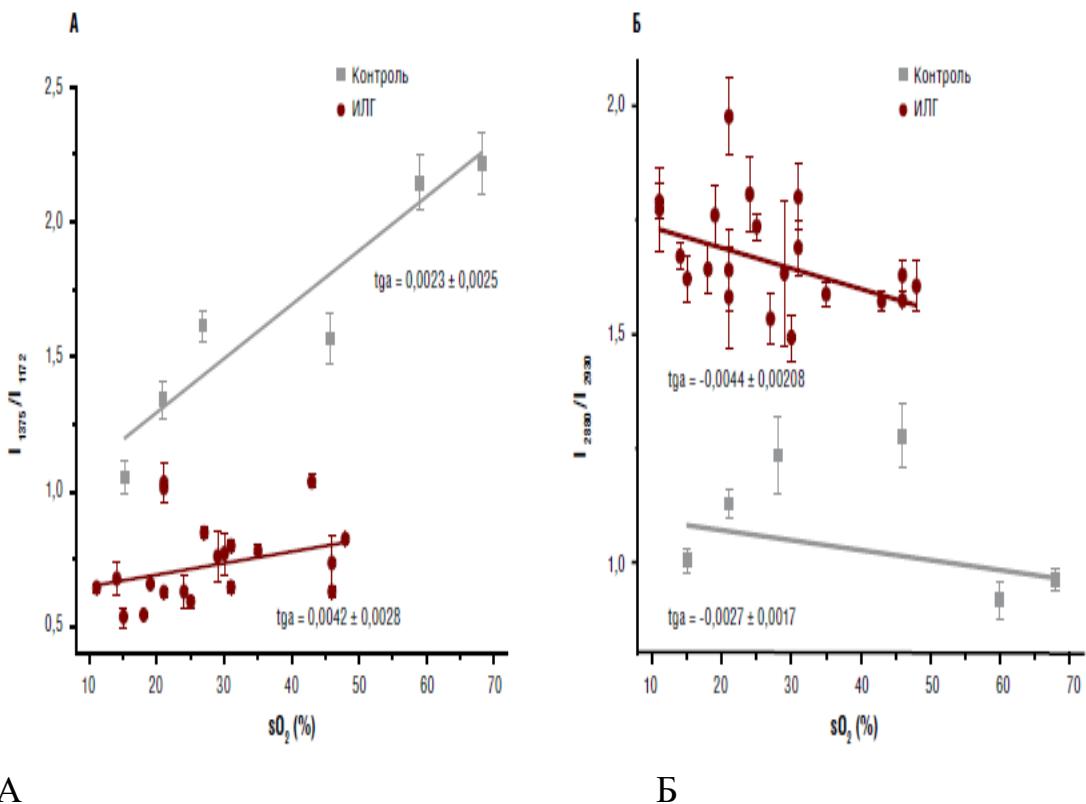


Рисунок 9. – Зависимость изменений конформации групповых колебаний пиррольных полуколец гема (А) и плотности упаковки глобина (Б) от насыщенности пробы кислородом (sO_2) в образцах цельной крови для ИЛГ и СЭ для контроля [120].

Обнаруженные нами различия конформации гема гемоглобина в норме и при патологии заключаются в переходе от «плоской» к «куполообразной» конформации порфиринового макроцикла у пациентов с ИЛГ, что выявлено при сравнении гемоглобина эритроцитов цельной крови. Также наблюдается разница между валентными колебаниями винильных колец гема отношение (I_{1580}/I_{1550}) и конформациями гема при связывании железа с NOx — этот параметр отражает сродство гемоглобина к кислороду и был выше в контрольной группе как в

цельной крови, так и в СЭ. У пациентов с подтвержденной ИЛГ была выявлена более плотная упаковка глобина в (отношение - I_{2880}/I_{2930}) в цельной крови, тогда как в выделенных эритроцитах плотность упаковки ниже. Всё это демонстрирует, что у больных ИЛГ структурные изменения в гемоглобине проявляются как на уровне гема (макроцикл и лиганд), так и глобина (упаковка белка) (Рисунок 10).

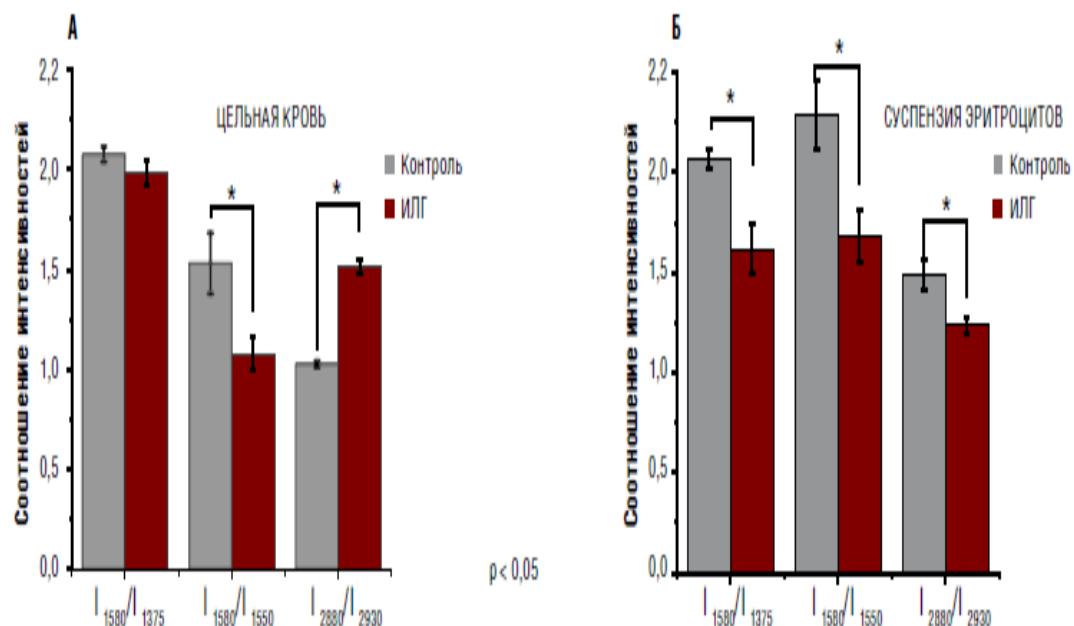


Рисунок 10. – Соотношение интенсивностей полос КР-спектра здоровых добровольцев и пациентов с подтвержденным ИЛГ (красные столбцы) для: А – Гб в эритроцитах цельной крови, Б – Гб в суспензии эритроцитов (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$)) [120].

Исследование конформации гема (отношение валентных колебаний связей винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец, I_{1580}/I_{1375}) демонстрирует, вероятно, зависимость изменение плотности упаковки глобина (I_{2880}/I_{2930}) при патологии от конформации гема. Как в контрольной группе, так и у пациентов с подтверждённой ИЛГ и упаковка молекулы глобина, и конформация гема существенно различаются. Это подтверждает структурные изменения при

ИЛГ, затрагивающие как макроцикл гема, так и белковую часть молекулы гемоглобина (Рисунок 11).

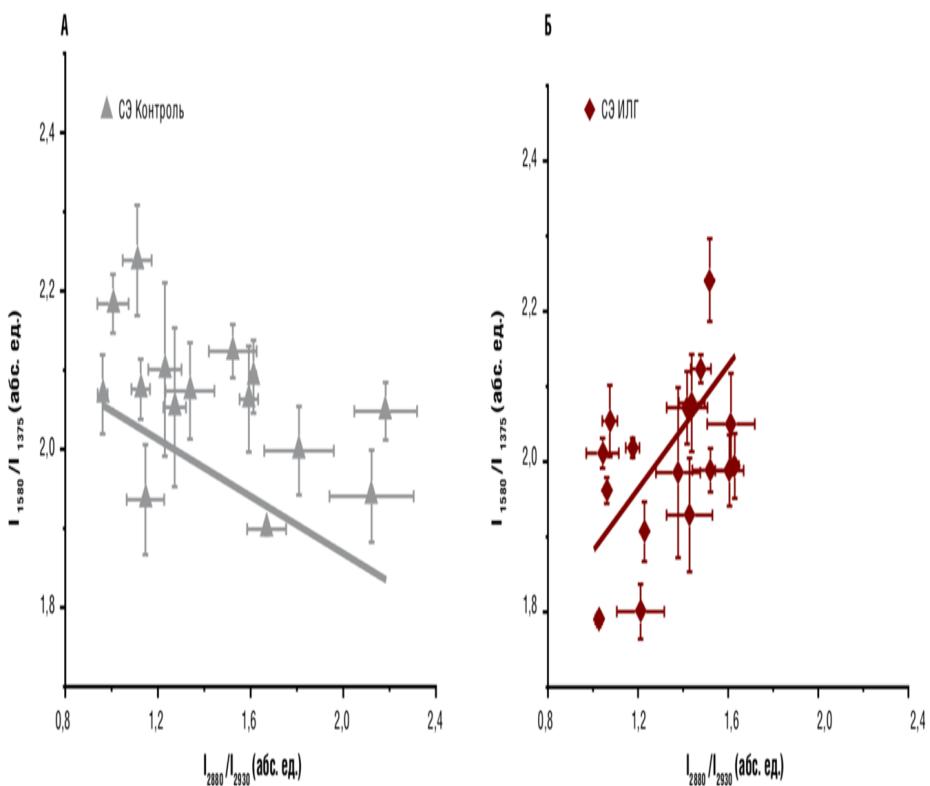


Рисунок 11. – Зависимость конформации гема от величины плотности упаковки глобина Гб в норме и при патологии. А – здоровые добровольцы, Б – пациенты с подтвержденным ИЛГ [120].

При аппроксимации зависимости изменений конформации гема от плотности упаковки глобина был получен противоположный характер корреляции для контрольной группы и пациентов с ИЛГ: для контроля тангенс угла наклона составил $-0,17 \pm 0,26$ (увеличение плотности упаковки глобина связано со снижением вероятности куполообразной конформации гема), а для ИЛГ — $0,41 \pm 0,14$ (увеличение плотности упаковки связано с ростом вероятности куполообразной конформации гема). Полученные нами результаты указывают на принципиальные различия в структуре и взаимодействии гема и глобина между контрольной группой и пациентами с ИЛГ.

3.1.3. Особенности конформации гема и глобина мембраннысвязанного гемоглобина у пациентов с ИЛГ

Ранее нами были выявлены особенности конформации гемоглобина, которые, относятся преимущественно к его цитоплазматической форме, составляющей более 90% от общего содержания. В настоящее серии исследования мы использовали метод ГКР для изучения особенностей мембраннысвязанного гемоглобина. Установлено, что у больных с ИЛГ существенно меняется структура гема и глобина: глобин в этой группе отличается менее плотной упаковкой (I_{2880}/I_{2930}), а количество гемоглобина с «куполообразной» конформации гема заметно возрастает. Помимо этого, отмечено повышенное сродство гемоглобина к кислороду (I_{1580}/I_{1550}) и увеличение вклада симметричных колебаний пиррольных колец в гемопорфирине (I_{1375}/I_{1172}) по сравнению с контрольными значениями (Рисунок 12) [120].

Представленные данные свидетельствуют о наличии серии перестроек молекулярной структуры гемоглобина в эритроците больных – сначала мембраннысвязанного гемоглобина, а затем Гб цитоплазмы. Вероятно, данный факт может быть ключевым моментом, первичным актом изменения функции переноса кислорода в сосудах у пациентов с ИЛГ, что открывает новые возможности для диагностики и терапии данного заболевания.

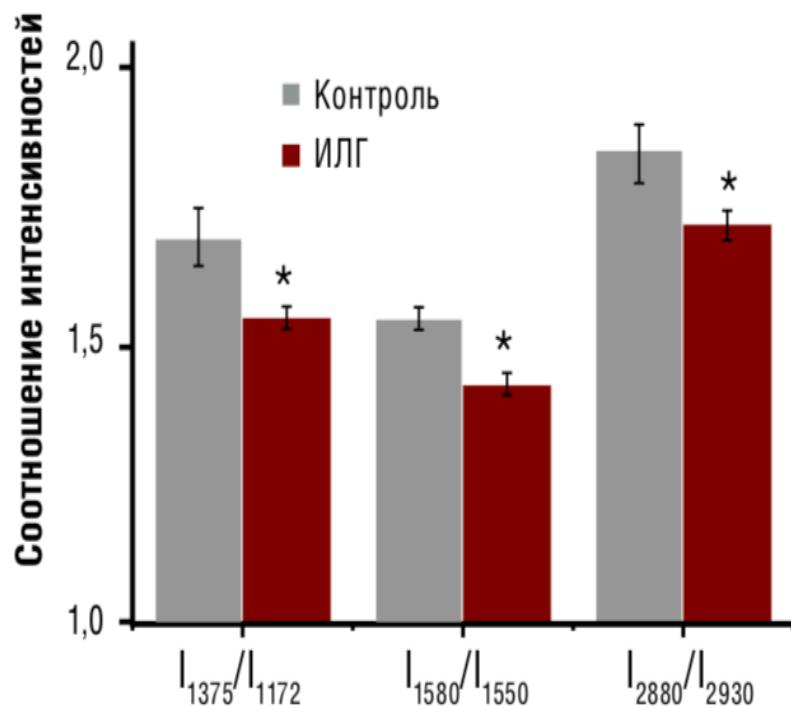


Рисунок 12. – Соотношение величин интенсивностей полос ГКР-спектра Гбмс СЭ здоровых доноров (контроль, серые столбы) и здоровых добровольцев с подтвержденным ИЛГ (красные столбы) при насыщении проб кислородом (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$) [120].

3.2. Анализ особенности конформации гемопорфирина гемоглобина в крови и суспензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с системной склеродермией

3.2.1. Клинико-инструментальная характеристика пациентов в группе ИЛГ и ЛАГ-ССД

В исследовании участвовали две группы пациентов: с ИЛГ (20 человек) и с ЛАГ-ССД (20 человек) (Таблица 5). Средний возраст в группе ИЛГ составил 41 год с интерквартильным размахом от 39 до 50 лет, тогда как у пациентов с ЛАГ-ССД медианный возраст был значительно выше и составил 64 года [57; 72]

($p=0,00005$), что соответствует мировым данным. Женщины преобладали в обеих группах, достигая 95% в группе ИЛГ и 80% в группе ЛАГ-ССД. Индекс массы тела был схожим между группами — 25 кг/м² [22,9; 30,0] в группе ИЛГ и 26 кг/м² [24; 29] у пациентов с ЛАГ-ССД ($p=0,52$). Медиана расстояния, пройденного в 6-минутном тесте ходьбы, была выше в группе ИЛГ (405 м [308; 423]) по сравнению с ЛАГ-ССД (320 м [300; 428]), однако статистической значимости различия не выявлено ($p=0,8$). Показатели насыщения крови кислородом (SpO₂) находились на сходных уровнях — 97% [96; 97,8] в группе ИЛГ и 93% [91,2; 97] у пациентов с ЛАГ-ССД ($p=0,4$).

Функциональное состояние оценивалось по классификации ВОЗ: во второй функциональный класс вошли 80% пациентов группы ИЛГ, а в третий — 20%. В группе ЛАГ-ССД распределение по функциональным классам было более равномерным — 70% и 30% соответственно.

Таким образом, отмечается значимая разница в возрасте структуре групп, при этом остальные показатели достоверно не отличались.

Таблица 5. – Клинико-демографическая характеристика пациентов с ИЛГ и ЛАГ-ССД на момент включения в исследование.

Параметры	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ-ССД (n=20)	p
Возраст, лет	41 [39; 50]	64 [57; 72]	0,00005
Женский пол, %	19 (95%)	16 (80 %)	0,7
ИМТ, кг/м ²	25 [22,9;30,0]	26 [24; 29]	0,55
Д6МХ, м	405 [308; 423]	320[300;428]	0,8
SpO ₂ , %	97[96;97,8]	93 [91,2; 97]	0,4
ФК по NYHA, %			0,6
II/ III	16 (80%)/ 4 (20%)	15 (70%)/ 5(30%)	

Примечание – данные представлены в виде Me [25 %; 75 %]. ИМТ-индекс массы тела, Д6МХ - дистанция 6 минутной ходьбы, SpO₂- насыщенность крови кислородом в артериальной крови, ФК-функциональный класс

На момент исследования всем пациентам проводилась ЭхоКГ, рентгенографии ОГК с обязательной оценкой гемодинамических показателей путем выполнения КПОС. По результатам ЭхоКГ (Таблица 6) медианное значение площади правого предсердия в группе ИЛГ составило $23,5 \text{ см}^2$ с межквартильным интервалом [19; 29], в то время как у пациентов с ЛАГ-ССД площадь была 22 см^2 [20; 24], различие статистически незначимо ($p=0,66$). Передне-задний размер правого предсердия был идентичным в обеих группах — $3,2 \text{ см}$ ($p=0,43$). Конечный диастолический размер левого желудочка также был сопоставим: $4,25 \text{ см}$ у ИЛГ и 4 см у ЛАГ-ССД ($p=0,24$). Диаметры ствола легочной артерии были близки — $3,2 \text{ см}$ в группе ИЛГ и $3,1 \text{ см}$ в группе ЛАГ-ССД ($p=0,33$). Показатель TAPSE, отражающий систолическую функцию правого желудочка, имел схожие значения: $1,65 \text{ см}$ у ИЛГ и $1,55 \text{ см}$ у ЛАГ-ССД ($p=0,91$). Однако среднее систолическое давление в легочной артерии (СДЛА) было значительно выше в группе ИЛГ — 88 мм рт.ст. против 68 мм рт.ст. в группе ЛАГ-ССД ($p=0,03$). Среднее давление (срДЛА) и давление заклинивания легочной артерии (ДЗЛА) показали различия: срДЛА не была статистически значимой (51 мм рт.ст. у ИЛГ против 48 мм рт.ст. у ЛАГ-ССД, $p=0,15$), тогда как ДЗЛА была существенно выше у ЛАГ-ССД — 11 мм рт.ст. против 8 мм рт.ст. у ИЛГ ($p=0,001$). Наличие выпота в перикарде выявлено у 35% пациентов с ИЛГ и 25% в группе ЛАГ-ССД.

Таблица 6. – Параметры ЭхоКГ для группы ИЛГ и ЛАГ- ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ ССД (n=20)	p
S ПП, см ²	$23,5 [19; 29]$	$22 [20; 24]$	0,66
ПЗР ПП, см	$3,2 [3; 3,9]$	$3,2 [2,85; 3]$	0,4
КДР ЛЖ, см	$4,25 [3,5; 4,5]$	$4 [3,6; 4,7]$	0,24
Ствол ЛА, см	$3,2 [3; 3,375]$	$3,1 [2,925; 3,2]$	0,33
TAPSE, см	$1,65 [1,4; 1,8]$	$1,55 [1,4; 2]$	0,91
СДЛА, мм рт.ст.	$88 [75; 103]$	$68 [57; 95]$	0,03

Продолжение таблицы 6. – Параметры ЭхоКГ для группы ИЛГ и ЛАГ- ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ ССД (n=20)	p
Ср.ДЛА, мм рт.ст.	51 [49,5;59,5]	48 [40,5;55,5]	0,15
ДЗЛА, мм рт.ст.	8 [7; 10]	11 [10; 13]	0,001
Наличие выпота в полости перикарда	7 (35%)	5 (25%)	0,78

Примечание – данные представлены в виде Me [25 %; 75 %]. С ПП- площадь правого предсердия, ПЗР ПП- передне-задний размер правого предсердия, КДР ЛЖ- конечно-диастолический размер левого желудочка, TAPSE- систолическая экскурсия кольца трехстворчатого клапана, СДЛА-систолическое давление легочной артерии, КПОС- катетеризация правых отделов сердца, срДЛА- среднее давление легочной артерии, ДЗЛА- давление заклинивания легочной артерии, СИ- сердечный индекс, SvO2- насыщенность крови кислородом

Рентгенологические данные по индексу Мура были сопоставимы между группами (36% для ИЛГ и 36,5% для ЛАГ-ССД, p=0,70), однако кардиоторкальный индекс (КТИ) был значимо выше у ЛАГ-ССД (57% против 49%, p=0,03) (Таблица 7). Таким образом, между группами ИЛГ и ЛАГ-ССД существенные отличия на эхокардиографии были зафиксированы лишь по систолическому и заклинивающему давлению в легочной артерии, а также по кардиоторкальному индексу по данным рентгенографии.

Таблица 7. – Параметры рентгенографии ОГК для группы ИЛГ и ЛАГ ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ ССД (n=20)	p
Индекс Мура, %	36 [31,25;43,75]	36,5 [31;44,75]	0,70
КТИ, %	49 [47;52]	57 [53;59]	0,00

Примечание – данные представлены в виде Me [25 %; 75 %]. КТИ- кардиоторкальный индекс

В рамках исследования проводилась оценка различных гемодинамических показателей по данным КПОС (Таблица 8): систолического давления в легочной артерии (СДЛА), среднего давления в легочной артерии (срДЛА), среднего давления правого предсердия (срДПП), сердечного индекса (СИ), насыщения венозной крови кислородом (SvO_2) и легочного сосудистого сопротивления (ЛСС). Медианные значения систолического давления в легочной артерии были выше в группе ИЛГ — 94 мм рт.ст. [82;113], по сравнению с 82 мм рт.ст. [59;100] в группе ЛАГ-ССД ($p=0,04$). Среднее давление в легочной артерии также показало значимое отличие: 61 мм рт.ст. [48;67] в группе ИЛГ и 50 мм рт.ст. [34;58] в группе ЛАГ-ССД ($p=0,007$).

Показатель среднего давления правого предсердия не продемонстрировал статистически значимой разницы между группами — 9 мм рт.ст. [6;10] в ИЛГ и 6 мм рт.ст. [5;9] в ЛАГ-ССД ($p=0,2$). Сердечный индекс был одинаковым для обеих групп и составил 2,3 л/мин/м² ($p=0,9$). Аналогичные данные получены для насыщения венозной крови кислородом, где медианы были 63% [59;69] и 64% [57;73] соответственно ($p=0,5$). Легочное сосудистое сопротивление отличалось в сторону увеличения у группы ИЛГ (917 дин*сек/см⁵ [762;1219]) в сравнении с ЛАГ-ССД (700 дин*сек/см⁵ [423;384]); однако статистическая значимость не достигнута ($p=0,1$). Таким образом, различия между группами по КПОС в основном отражены в систолическом и среднем давлении в легочной артерии, свидетельствуя о более выраженной нагрузке на легочную гемодинамику у пациентов с ИЛГ.

Таблица 8. – Параметры КПОС для группы ИЛГ и ЛАГ-ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ- ССД (n=20)	p
СДЛА, мм рт.ст.	4 [82; 113]	82 [59; 100]	0,04
Ср.ДЛА, мм рт.ст.	61[48;67]	50 [34;58]	0,007
Ср.ДПП, мм рт.ст.	9 [6;10]	6 [5;9]	0,2

Продолжение таблицы 8. – Параметры КПОС для группы ИЛГ и ЛАГ-ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ- ССД (n=20)	p
СИ, л/мин/м ²	2,3 [1,9;2,6]	2,3 [1,7;3,1]	0,9
СВ ₂ , л/мин	3,8 [3,2; 4,2]	3,7 [5; 2,6]	0,8
SvO ₂ , %	63 [59;69]	64 [57;73]	0,5
ЛСС, дин*сек/см ⁵	917 [762;1219]	700[423;384]	0,1

Примечание – данные представлены в виде Me [25 %; 75 %]., СДЛА-sistолическое давление легочной артерии, срДЛА- среднее давление легочной артерии, срДПП- среднее давления в правом предсердии, СИ- сердечный индекс, СВ- сердечный выброс, SvO₂- насыщенность крови кислородом в венозной крови, ЛСС- легочное сосудистое сопротивление

В исследовании при первичном обследовании пациентов были получены следующие лабораторные показатели (Таблица 9). Уровень гемоглобина среди участников с ИЛГ составлял медиану 14,9 г/дл (интерквартильный размах 11,8–16,3), а в когорте с ЛАГ-ССД данный показатель был чуть ниже — 13,1 г/дл [12,2–14,4], однако достоверно не различался (p=0,16). Показатель гематокрита также был несколько выше у пациентов с ИЛГ — 45,1% против 39,9% у группы с ЛАГ-ССД, однако это различие оказалось статистически незначимым (p=0,24). Уровень эритроцитов оказался достоверно выше в группе ИЛГ — медиана $5,4 \times 10^{12}/\text{л}$ (диапазон 4,7–5,9) по сравнению с $4,7 \times 10^{12}/\text{л}$ (4,1–5,1) для больных ЛАГ-ССД (p=0,004). По концентрации NT-proBNP отмечалось обратное соотношение: в группе ЛАГ-ССД его уровень был выше — 1813 пкг/мл [500–3000], тогда как у участников с ИЛГ медиана составляла 823 пкг/мл [218,7–1500] (p=0,03). Что касается уровня Д-димера, у пациентов с ИЛГ наблюдалось меньшее значение (0,26 мкг/мл с диапазоном 0,15–0,31), тогда как в группе ЛАГ-ССД медиана составила 0,36 мкг/мл [0,26–0,61] (p=0,005). Таким образом, при сравнении лабораторных данных между исследуемыми группами статистически значимые различия были выявлены по количеству эритроцитов, значению NT-proBNP и

уровню Д-димера, где у пациентов с ЛАГ-ССД уровни ВНР и Д-димера были выше, а эритроциты — ниже, чем у пациентов с ИЛГ.

Таблица 9. – Параметры лабораторных данных для группы ИЛГ и ЛАГ ССД.

Показатели	Группа ИЛГ (n=20)	Группа ЛАГ ССД (n=20)	p
Гемоглобин, г/дл	14,9 [11,8; 16,3]	13,1 [12,2;14,4]	0,16
Гематокрит, %	45,1 [36,8; 48,5]	39,9 [36,7; 43,1]	0,24
Эритроциты, 10 ¹² /л.	5,4 [4,7; 5,9]	4,7 [4,1; 5,1]	0,004
NT-proBNP, пкг/мл	823 [218,7; 1500]	1813 [500; 3000]	0,03
Д-димер, мкг/мл	0,26 [0,15; 0,31]	0,36 [0,26; 061]	0,005

Примечание – данные представлены в виде Me [25 %; 75 %].

3.2.2. Оценка кислород транспортной функции гемоглобина в группе ИЛГ и ЛАГ- ССД

В проведённом анализе, у пациентов с ИЛГ и ЛАГ-ССД выявлены значимые особенности спектральных параметров КР крови (Рисунок 13). Параметр спектра КР крови - I_{1375}/I_{1172} , отражающий групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине был достоверно выше в группе ИЛГ, как в цельной крови, так и в выделенных эритроцитах (СЭ). Соотношение I_{1580}/I_{1375} , коррелирующий с конформацией гема гемоглобина при различной эффективности сброса лиганда (выделение кислорода) в цельной крови был достоверно выше в группе ЛАГ-ССД, однако в выделенных эритроцитах данный показатель был выше в группе ИЛГ. Для показателя сродства гемоглобина к лигандам (I_{1580}/I_{1550}) также выявлен более высокий уровень в группе ИЛГ, что отмечалось как в цельной крови, так и в выделенных эритроцитах.

Отметим, что показатель, характеризующий изменения конформации глобина за счет валентных колебаний аминокислотных остатков (I_{2880}/I_{2930}) не

отличался между группами при патологии. Вероятно, что у пациентов с ЛАГ-ССД транспорт кислорода гемоглобином, осуществляется менее эффективно, что отражается специфической конформацией белковой структуры и может служить объяснением выявленных различий [121].

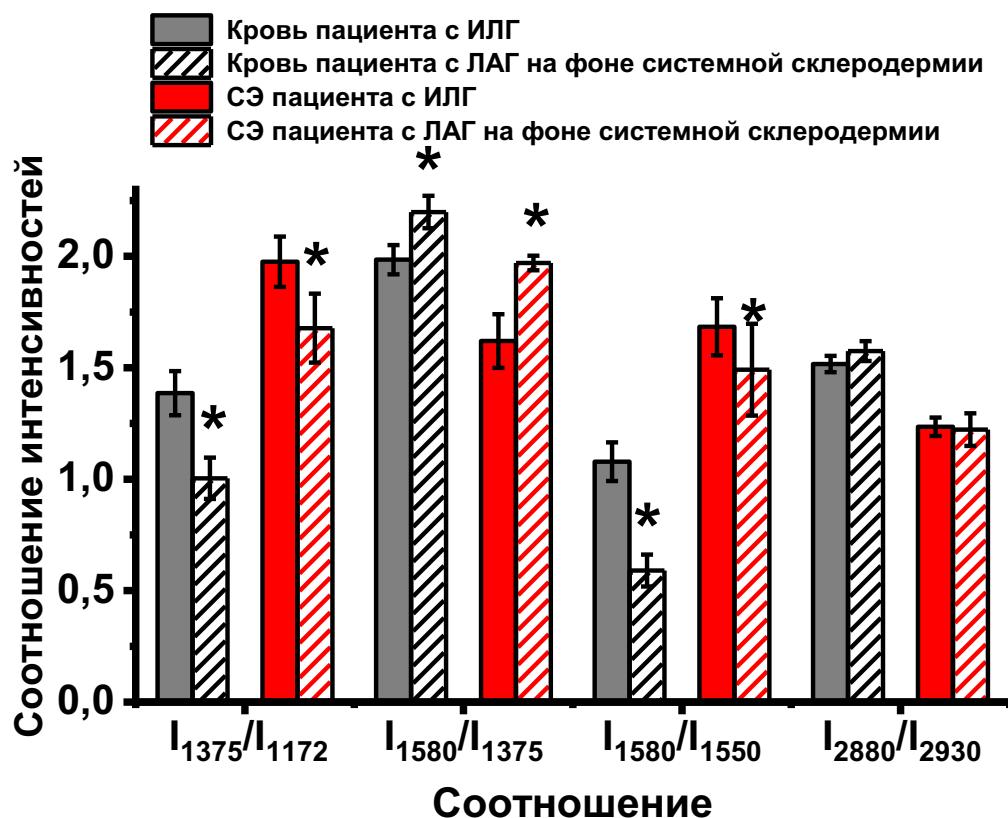


Рисунок 13. – Соотношение величин интенсивности интенсивностей полос КР-спектра контрольной группы, пациентов с подтвержденным ИЛГ и пациентов с ЛАГ -ССД в эритроцитах цельной крови и суспензии эритроцитов (заштрихованные столбцы, СЭ), * обозначены статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$) [121].

3.3. Влияние ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг, на клинико-функциональный, гемодинамический статус больных и особенности конформации гемопорфирина гемоглобина

Известно, что оценка эффективности ЛАГ-специфической терапии в настоящее время является актуальной проблемой в клинике. В настоящей работе, была предложена оригинальная методика и разработан эффективный подход для анализа изменений особенностей конформации гемоглобина эритроцитов в цельной крови и выделенных эритроцитов с помощью КР-спектроскопии [122].

3.3.1 Исходная клинико-инструментальная характеристика пациентов с ИЛГ до назначения селексипага

Для формирования группы пациентов в ходе исследования терапии селексипагом проводился комплексный анализ клинико-инструментальных данных (Таблица 10).

Таблица 10. – Характеристика пациентов, получавших селексипаг.

Характеристика	Данные (n=14)
Возраст на момент инициации терапии селексипагом, лет	43,0 [40,0; 50,8]
Женщины, %	78,6% (n=11)
ИМТ на момент инициации терапии селексипагом, кг/м ²	27,0 [25,3; 31,5]
КПОС	
Ср.ДЛА в покое, мм рт.ст.	58,0 [52,0; 67,8]
СДЛА, мм рт.мт.	93,5 [83,3; 109,5]
ДПП, мм рт.ст.	7,0 [5,0; 9,0]

Продолжение Таблицы 10. – Характеристика пациентов, получавших селексипаг.

Характеристика	Данные (n=14)
ДЗЛА, мм рт. ст.	7,5 [7,0; 8,8]
СВ, л/мин	3,2 [2,7; 3,8]
СИ, л/мин/м ²	1,8 [1,4; 2,1]
SvO ₂ , %	56,5 [53,8; 59,8]
ЛСС, ед. Вуда	16,5 [11,7; 18,6]
Время от постановки диагноза ЛАГ до инициации терапии селексипагом, мес	35,0 [10,0; 69,0]
Время от первого назначения ЛАГ-специфической терапии до назначения селексипага, мес	25,0 [8,8; 69,0]
ФК (ВОЗ), число (%)	
I	0 (0)
II	3 (21,4)
III	11 (78,6)
IV	0 (0)
Д6МХ, м	405,0 [366,3; 438,3]
Одышка по шкале Борга, балл	5,0 [4,0; 5,0]
NT-proBNP, пкг/мл	550,1 [241,3; 1359,5]
Явления ПЖ СН, %	14,3 (n=2)
S ПП, см ²	26,5 [20,6; 29,5]
Выпот в полости перикарда, %	57,1 (n=8)

Данные опубликованы в [122]. Примечания: данные представлены в виде медианы, 25% и 75% перцентилей ИМТ -индекс массы тела, КПОС-катетеризация правых отделов сердца, срДЛА- среднее давление легочной артерии, СДЛА-систолическое давление легочной артерии,

ДПП- давление в правом предсердии, ДЗЛА- давление заклинивания легочной артерии, СВ-сердечный выброс, СИ- сердечный индекс, SvO₂- насыщенность крови кислородом в венозной крови, ЛСС- легочное сосудистое сопротивление, Д6МХ- дистанция б минутной ходьбы, NT-proBNP – мозговой натрийуретический пептид, ПЖ СН- правожелудочковая сердечная недостаточность, S ПП-площадь правого предсердия.

Для изучения динамики изменений конформации гемопорфирина гемоглобина в зависимости от эффективности ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг в составе различных лекарственных схем, в проспективное исследование включено 14 пациентов с ИЛГ, отмечалось существенное преобладание в группе женщин (78,6%). Всем включенными в исследование пациентам инициировалась терапия селексипагом.

Контрольный визит проводился через 12 месяцев стабильного приема ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг. Всем пациентам, включенными в проспективное наблюдение, на первом визите до инициации терапии селексипагом и через 12 месяцев проводились лабораторные исследования крови, включая помимо рутинных анализов (общий, биохимический анализ, уровня NT-proBNP) проведена КР-спектроскопии, а также определения Д6МХ с оценкой индекса Борга и SpO₂, ЭхоКГ, КПОС.

После обследования назначение селексипага пациентам происходило преимущественно в составе тройной комбинированной ЛАГ-специфической терапии (71,4% пациентов), реже использовались двойные комбинации (28,6%). Самыми популярными вариантами двойной терапии служили комбинации селексипага и риоцигуата, применяемая у 14,4% больных. Если речь шла о тройных схемах, чаще всего сочетались селексипаг с силденафилом либо селексипаг с риоцигуатом и макитентаном; обе эти комбинации встречались с частотой 21,4%. В среднем с момента постановки диагноза ЛАГ до добавления селексипага проходило около 35 месяцев (диапазон от 10 до 69), а переход к терапии селексипагом после первичного назначения ЛАГ-специфических препаратов происходил в промежутке примерно 25 месяцев (от 8,8 до 69,0). В течение года все пациенты сохраняли стабильные дозировки поддерживающих

препаратов, среди которых чаще всего применялись антагонисты альдостерона (назначались 92,9% участников), петлевые диуретики (85,7%), а антикоагулянты получали почти 4 из 5 пациентов (78,6%). Отдельно отмечено, что в исследование попали пациенты с отрицательными результатами вазореактивного теста, которые ранее не получали блокаторы кальциевых каналов [122].

3.3.2 Оценка долгосрочной эффективности селексипага в составе ЛАГ-специфической терапии

В серии проведённых экспериментов оценивалось состояние пациентов спустя 12 месяцев после начала терапии селексипагом. Было зафиксировано значительное улучшение функционального статуса: дистанция 6-минутной ходьбы увеличилась до 445,0 м [431,3; 512,0] ($p<0,05$), а интенсивность одышки по шкале Борга уменьшилась до 3,0 баллов [1,3; 3,0] ($p<0,05$) (Таблица 11). При этом уровень NT-proBNP снизился до 242,3 нг/л [96,9; 816,3]. Положительные изменения подтвердились и при инвазивном гемодинамическом исследовании: сердечный выброс увеличился до 4,0 л/мин [3,2; 4,7], а сердечный индекс — до 2,2 л/мин \cdot м 2 [2,1; 2,6] ($p<0,05$). Антипролиферативное и антифибротическое действие селексипага на сосудистую стенку легочной артерии проявилось в снижении легочного сосудистого сопротивления до 11,2 единиц Вуда [9,4; 15,0] ($p<0,05$).

Таблица 11. – Результаты лечения пациентов с ИЛГ, получавших селексипаг в составе комбинированной схемы через 12 месяцев.

Показатели	Исходно	Через 12 месяцев терапии селексипага	p
Д6МХ, м	405,0 [366,3-438,3]	445,0 [431,3-512,0]	0,003

Продолжение таблицы 11. – Результаты лечения пациентов с ИЛГ, получавших селексипаг в составе комбинированной схемы через 12 месяцев.

Показатели	Исходно	Через 12 месяцев терапии селексипага	p
Одышка по Боргу, баллы	5,0 [4,0-5,0]	3,0 [1,3-3,0]	0,01
NT-proBNP, пкг/мл	550,1 [241,3-1359,5]	242,3 [96,9-816,3]	0,01
СВ, л/мин	3,2 [2,7-3,8]	4,0 [3,2-4,7]	0,01
СИ, л/мин/м ²	1,8 [1,4-2,1]	2,2 [2,1-2,6]	0,003
ЛСС, ед. Вуда	1320,0 [932,1-1487,1]	895,5 [752,2-1196,3]	0,01
SvO ₂ , %	56,5 [53,8-59,8]	64,5 [60,3; 66,8]	0,003

Примечания: данные представлены в виде медианы, 25% и 75% перцентилей, Д6МХ-дистанция в тесте 6 минутной ходьбы, NT-proBNP – мозговой натрийуретический пептид, СВ – сердечный выброс, СИ – сердечный индекс, ЛСС – легочное сосудистое сопротивление, , SvO₂ – насыщенность крови кислородом в венозной крови

Кроме того, улучшился газообмен — с достоверным увеличением насыщения венозной крови кислородом до 64,5% [60,3; 66,8] ($p<0,05$). Несмотря на явные положительные результаты терапии селексипагом в рамках двойных и тройных ЛАГ-специфических схем, 4 пациента (28,6%) потребовали её усиления путём добавления третьего препарата или замены компонентов внутри тройной терапии, направленных на один механизм патогенеза [122].

Таким образом, 12-месячная терапия селексипагом в составе комбинированных схем приводила к устойчивому функциональному и гемодинамическому ответу с улучшением насыщения венозной крови кислородом.

3.3.3. Динамика свойств конформации через 12 месяцев ЛАГ-специфической терапии, включавшей селексипаг

При исследовании крови пациентов с помощью КР-спектроскопии удалось зарегистрировать полосы, которые отвечают колебаниям гема (на частотах 1000–1800 см^{-1}) и глобина (2800–3000 см^{-1}) (Рисунок 14). Эти полосы отражают основные вибрационные моды в составе гемоглобина и позволяют судить о его структурном состоянии. После назначения селексипага были зафиксированы характерные изменения: интенсивность полосы на 1640 см^{-1} уменьшилась, что связано с уменьшением количества комплексов Гб-НОх. Подобные комплексы могут встречаться как в эритроцитах цельной крови, так и в изолированных клетках, и их содержание влияет на структуру белка.

Для высокочастотной области наблюдается смещение полос на 2850 и 2880 см^{-1} в сторону низкочастотной области — это ослабление спектральных характеристик на $3\pm0,4 \text{ см}^{-1}$. Такие изменения принято рассматривать как признак изменений в конфигурации белковой молекулы, в частности — глобина. Скорее всего, эти изменения обусловлены укорочением длины сопряжения водородных связей между аминокислотными остатками глобина, что оказывает влияние на стабилизацию его самой структуры и может изменять его функцию.

Таким образом, применение селексипага приводит не только к биохимическим изменениям, но и к изменению тонкой структуры гемоглобина, что находит отражение в спектральных характеристиках белков крови.

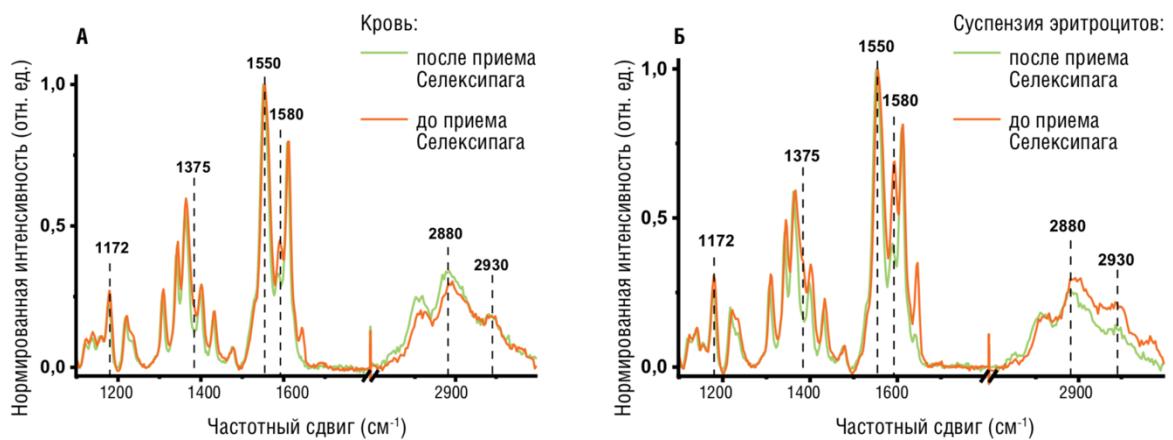


Рисунок 14. – Характерный КР-спектр эритроцитов цельной крови (А) и изолированных эритроцитов (Б) до и после терапии селексипагом [122].

При анализе особенности конформацию гемоглобина, как в цельной крови, так и в СЭ до и после приема селексипага были выявлены следующие различия (Рисунок 15). В цельной крови групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине гема (I_{1375}/I_{1172}) были достоверно выше, чем в ГБ после терапии селексипагом, что не выявлено в выделенных эритроцитах. Параметр КР-спектра (I_{1580}/I_{1375}), характеризующий конформацию гема, при которой меняется способность Гб выделять лиганды, не менялся как в цельной крови, так и в СЭ. Соотношения интенсивности полос КР-спектра (I_{1580}/I_{1550}) демонстрирующее конформацию гема с различным сродством к лигандам (в частности, к кислороду) были достоверно выше после терапии селексипагом для ГБ эритроцитов цельной крови, но не в СЭ. Параметр КР-спектра (I_{2880}/I_{2930}), характеризующий конформацию глобина и отражающий различия между валентными колебаниями аминокислотных остатков глобина был достоверно выше в цельной крови до лечения селексипагом, однако в СЭ был достоверно выше после лечения.

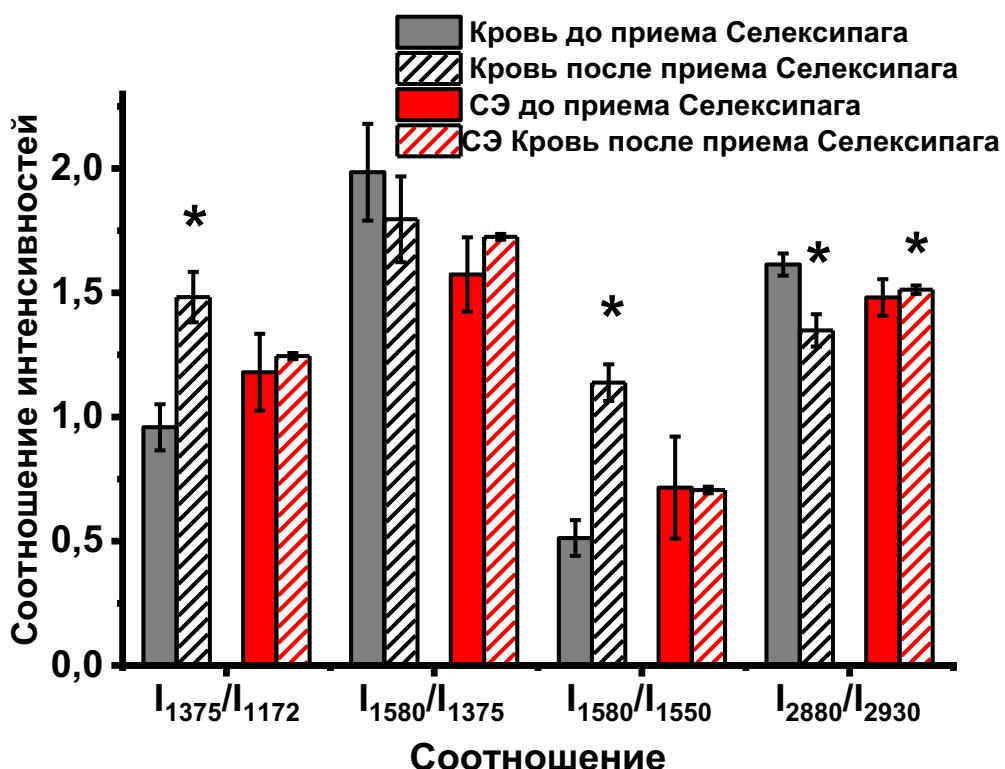


Рисунок 15. – Соотношение величины интенсивностей полос КР-спектра эритроцитов цельной крови (черные столбцы) и изолированных эритроцитов (красные столбцы) пациентов со ИЛГ до и после применения селексипага (* обозначено статистически значимые различия между пробами контроля и ИЛГ ($p < 0,05$), $n=14$) [122].

Таким образом, установлено, что на фоне комплексного лечения пациентов ЛАГ-специфической терапией, включающей селексипаг, существенно изменяется конформация цитоплазматического Гб» [122].

3.4 Разработка способа оценки тяжести состояния пациентов с идиопатической легочной гипертензией с использованием метода КР-спектроскопии

С помощью КР-спектроскопии можно обнаружить взаимосвязь между колебаниями СН-групп в геме Гб и функциональным классом заболевания в связи

с особенностями конформации гема, что определяет нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов при патологии.

Границы референсных интервалов (95% интервалов) для отношений КР пиков рассчитывали при помощи программы Medcalc 15.8. Из-за небольшого количества участников для определения границ референсного интервала использовался робастный метод, не требующий обязательного соответствия оцениваемой выборки нормальному распределению и устойчивый к выбросам. Метод предлагает использование специального робастного алгоритма, присваивающего значениям выборки различный вес в зависимости от удаленности медианы, которая используется как центральное значение (в качестве меры разброса использовалось медианное абсолютное отклонение относительно медианы). Процедура определения границ интервалов включала в себя: 1) определение двустороннего референсного интервала (внутри 2,5 и 97,5 перцентилей) для отношений КР измеренных у здоровых добровольцев; 2) определение нижней границы (5% перцентиль) для отношений КР измеренных у пациентов с начальной стадией заболевания (верхняя граница данного интервала соответствовала нижней границе референсного интервала полученного для здоровых добровольцев); и 3) если измеряемое КР отношение было меньше нижней границы референсного интервала для начальной стадии заболевания, то пациентов с таким отношением относили к тяжелой стадии заболевания. Мы считаем, что наиболее информативным с точки зрения определения тяжести ИЛГ является контроль за изменениями конформации гема ГБ по величине соотношения I_{1580}/I_{1550} — оно оказалось самым чувствительным для данного типа патологии.

Итак, нами предложен способ оценки стадии ИЛГ по величине соотношения интенсивности пиков КР–спектра I_{1580}/I_{1550} , которое отлично как от контрольной группы в образцах цельной крови, так и между ФК в образцах СЭ (Таблица 12).

Таблица 12. – Изменения величин величины соотношения величины интенсивности максимумов КР – спектра (I_{1580}/I_{1550}) различных групп больных.

Характеристика	Величина соотношения пика I_{1580}/I_{1550} , у.е.	
	Цельная кровь	Суспензия эритроцитов
Норма, отсутствие ИЛГ	1,98–1,68	3,16–2,82
Начальная стадия ИЛГ, 1–2 ФК	1,67–1,04	2,81–2,64
Поздняя стадия ИЛГ, 3–4 ФК	$\leq 1,03$	$\leq 2,63$

Пример 1.

Пациент П. был госпитализирован с жалобами на боли в грудной клетке давящего характера с иррадиацией в левую подлопаточную область, одышку при минимальной физической нагрузке (при подъеме на 2 лестничный пролет), учащенное сердцебиение, сухой приступообразный кашель, отеки нижних конечностей, больше слева.

Было проведено исследование крови из кубитальной вены методом комбинационного рассеяния (КР). В результате установлено, что величина соотношения I_{1580}/I_{1550} для КВ цельной крови пациента П. составляет 1,82, что входит в диапазон референсных значений КВ контрольной группы (1,98-1,68), а соотношения I_{1580}/I_{1550} для КВ в суспензии эритроцитов составило 2,82, что также вошло в диапазон референсных значений КВ контрольной группы (2,84-2,78 у.е.). На основании полученных данных об изменении конформации гема ГБ можно исключить патологические изменения функции в кислород-транспортной системе и с высокой степенью вероятности предполагать отсутствие у пациента ИЛГ, без необходимости проведения КПОС.

Пример 2.

Пациент Н. был доставлен в отделение с жалобами на одышку при физической нагрузке (ходьба до 100 метров), эпизоды синкопальных состояний.

Было проведено исследование крови из кубитальной вены методом комбинационного рассеяния (КР). В результате получено, что величина соотношения I_{1580}/I_{1550} для цельной крови пациента К. составляет 0,89, а величина соотношения I_{1580}/I_{1550} для суспензии эритроцитов составляет 1,36, что вошло в диапазон референсных значений, соответствующих тяжелой степени легочной гипертензии и необходимости проведения инвазивного дообследования (для цельной крови $< 1,03$, а для суспензии эритроцитов $< 2,63$). На основании полученных данных об изменении конформации гема ГБ, можно характеризовать патологические изменения функции кислород-транспортной системе, пациенту рекомендовано проведение КПОС.

Таким образом, использование параметров КР-спектроскопии, а именно величин соотношений пиков спектра, позволяет неинвазивно оценивать тяжесть пациента с ИЛГ и определять показания к проведению КПОС. Предложенный нами метод позволяет снизить количество инвазивных вмешательств у больных ЛАГ, а также связанных с ними осложнений [89].

Глава 4. Обсуждение

Идиопатическая лёгочная гипертензия сохраняет за собой статус орфанного заболевания, которое при отсутствии своевременной постановки диагноза и начала эффективного лечения, характеризуется быстрым прогрессированием и неблагоприятным прогнозом. Симптомы данного заболевания на ранних стадиях часто могут проявляться постепенно и могут быть схожи с другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, что затрудняет раннюю диагностику. Для верификации диагноза ЛАГ требуется целый комплекс специфических исследований, включая выполнение инвазивной процедуры- КПОС для оценки легочной гемодинамики. Поиск неинвазивных методов для оценки тяжести заболевания представляется актуальной и практически значимой задачей.

КР-спектроскопия представляется уникальным методом диагностики для оценки вклада гипоксии в развитие ЛАГ, обладая такими свойствами как; неинвазивность и возможность анализа цельной крови, высокая чувствительность к конформационным изменениям гема, способность различать различные формы гемоглобина, высокая пространственная и спектральная точность, а также возможность динамического мониторинга. Таким образом, КР-спектроскопия является мощным, неинвазивным инструментом для оценки кислородтранспортной функции гемоглобина у пациентов с ЛАГ за счет своей способности выявлять тонкие структурные изменения в геме, точно определять степень насыщения кислородом и прослеживать молекулярные эффекты патологических состояний и терапии.

Главным механизмом развития ИЛГ считается эндотелиальная дисфункция, приводящая к дефициту вазоактивных веществ (оксид азота, простациклин), что ведёт к сужению сосудов, пролиферации клеток и структурной перестройке лёгочных артерий. Одновременно повышается уровень вазоконстрикторных и пролиферативных медиаторов (тромбоксан А2, эндотелин-1). Нарушение работы митохондрий и снижение синтеза АТФ способствуют развитию дисфункции ПЖ:

метаболизм смещается к анаэробному, усиливается поглощение глюкозы для компенсации энергетического дефицита. Определяется моноклональная природа эндотелиальных клеток, нарушение регуляции HIF-1 α , устойчивость к апоптозу, что повышает сосудистое сопротивление и усугубляет декомпенсацию ПЖ. Патогенез ИЛГ является многофакторный с вовлечением различных биохимических и биофизических процессов. Эти морфологические и транспортные изменения приводят к гипоксии, ухудшению транспорта газов и затрудняют своевременную диагностику, что может привести к тяжёлым последствиям.

В связи со сказанным, в настоящее время необходимо разрабатывать и внедрять эффективные и рентабельные методы диагностики, одним из которых является КР-спектроскопия. Как мы отмечали ранее, методика КР-спектроскопии позволяет оценивать не только состав и конформацию биологических молекул при функциональном состоянии клеток, а также может служить основанием для формирования технологии диагностики и скрининга эффективности различных новых фармакологических препаратов и терапии.

На первом этапе исследования нами были получены оригинальные данные, свидетельствующие об особенностях конформации гемопорфирина гемоглобина в эритроцитах крови и выделенных эритроцитах из кубитальной вены пациентов с идиопатической легочной гипертензией и здоровых добровольцев [120]. Этот результат свидетельствует о том, что при патологии, на молекулярном уровне происходит перестройка конформации гема гемоглобина, которая меняет способность крови насыщать ткани кислородом, т.е. гипоксии. Важно, что исследование проводилось на трех системных уровнях (эритроциты в крови, выделенные эритроциты и гемоглобин в различных участках эритроцита), что впервые позволило сопоставить особенности конформации гема в норме и при патологии.

В группу с верифицированным диагнозом ИЛГ (без ЛАГ специфической терапии или на отмывочном периоде) вошло 39 пациентов, в группу «здоровых добровольцев» (контроль) вошли 10 человек.

В ходе проведенного исследования, нами были выявлены различия в характеристиках КР – спектров гема и глобина между группой контроля и пациентов с ИЛГ, обнаружены конформационные изменения порфиринового макроцикла, специфичные для пациентов с ИЛГ. Действительно, такой параметр КР-спектра как отношение интенсивности полос - $(I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375}))$, который пропорционален доле оксигемоглобина, отличался между двумя группами. Этот факт подтверждает наше предположение о том, что при патологии и в норме в конформации гема и способности связывать лиганды появляются существенные особенности, которые могут быть связаны как с изменением молекулярной структуры порфиринового макроцикла, и, вероятно, потом конформации белковой глобулы глобина гемоглобина. Возможно, это является проявлением действия ряда факторов заболевания, действующих как непосредственно на гемоглобин, так и опосредованно, после изменения состояния эритроцита.

Сказанное подтверждается результатами контроля за изменениями другого параметра, характеризующего изменение конформации молекулы. Показатель, который отражает вклад валентных колебаний винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец, а также отражающий относительную способность гемоглобина выделять лиганды, в том числе кислород ($I_{1580}/I_{1375})$ [123]. В группе ИЛГ цельной крови достоверно не отличался от контроля, однако в СЭ был достоверно выше в группе контроля, что свидетельствует о важной роли компонентов плазмы в поддержании постоянного уровня насыщения эритроцитов кислородом. Кроме того, ввиду снижения площади эритроцитов и их более жесткой стенки при ИЛГ относительно контроля, мы предполагаем, что Гб в СЭ имеет меньшую поверхность для осуществления кислород-транспортного обмена через белок полосы 3 и мембраносвязанного Гб.

В рамках проведенного исследования удалось выявить различные конформационные особенности гема в гемоглобине, проявляющиеся при идиопатической легочной гипертензии. В условиях патологии гем все чаще переходит в куполообразную форму, и это характерно не только для цельной крови, но и для выделенных эритроцитов. Таким образом, установлено, что

пространственная организация порфиринового макроцикла эритроцитов и их мембраносвязанных структур у больных ИЛГ принципиально отличается от контроля, приобретая специфические особенности молекулярной структуры гема и глобина, которые могут отражать фундаментальные молекулярные механизмы болезни [120].

В ходе анализа данных нами были выявлены особенности конформации не только гема, но и глобина гемоглобина в эритроцитах пациентов с ИЛГ. Анализ колебаний в аминокислотных группах глобина (соотношение I_{2880}/I_{2930}), свидетельствует о том, что упорядоченность третичной структуры глобина и, соответственно, плотность упаковки белковой глобулы, при патологии существенно изменяется. Изменения конформации глобина, вероятно, связаны не только с изменениями в структуре гема, но и с изменениями в организации расположения гемоглобина внутри цитоплазмы клетки. Этот феномен, известный как «молекулярный краудинг», отражает воздействие высокой плотности макромолекул на динамику и конформационные свойства белков, что может влиять на функциональное состояние гемоглобина в патологических условиях [120].

Установлено, что зависимость конформации гема от конформации глобина различна у здоровых и пациентов с ИЛГ: в контроле более компактная укладка глобина ассоциирована с пониженной вероятностью куполообразной конформации гема, а при ИЛГ - наоборот. Обнаруженные нами закономерности могут объясняться как изменением электростатических характеристик мембранных в условиях гипоксии, так и специфическими нарушениями пространственной организации гемоглобина внутри клеточной цитоплазмы-например, дисбалансом между мембраносвязанным и свободными цитоплазматическим пулом белка, меняющимся при патологических состояниях.

Известно, что в процессах кислородного транспорта большую роль играет мембраносвязанный гемоглобин, который непосредственно участвует в первичном акте переноса молекул кислорода от поверхности мембран к цитоплазматическому Гб. В группе ИЛГ отношения, которые характеризуют плотность упаковки

(I_{2880}/I_{2930}), молекулу гема в «куполообразной» конформации (I_{1580}/I_{1550}), а также параметр отражающий колебаний пиррольных колец в гемопорфирине (I_{1375}/I_{1172}) мембраносвязанного гемоглобина были достоверно ниже, чем в группе контроля. Данные особенности конформации мембраносвязанного гемоглобина вероятно являются причиной снижения эффективности переноса кислорода эритроцитами в сосудах и формированию гипоксии ткани и организма. Вероятно, первичным механизмом таких изменений являются нарушения электростатического взаимодействия между дезоксигемоглобином и белком полосы 3.

В результате исследования нами доказана важная роль формирования молекулярно-клеточной гипоксии в патогенезе ИЛГ. Данное состояние обусловлено рядом причин; повышение давления в легочной артерии может приводить к повреждению эндотелия и ремоделированию сосудов, следствием чего является уменьшение количества функциональных капилляров, что снижает площадь газообмена. В свою очередь, изменение в гемодинамической картине, может приводить к нарушению кровообращения и затруднению обеспечения тканей кислородом. Результатом вышеперечисленных процессов является снижение сатурации кислорода крови у пациентов с ИЛГ.

Следующим этапом мы проводили исследования по изучению изменения конформации гемопорфирина гемоглобина в крови и суспензии эритроцитов у пациентов с идиопатической легочной гипертензией и легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с системной склеродермией. В группу сравнения кислород-транспортной функции между пациентам с ИЛГ и ЛАГ-ССД вошло по 20 человек с каждой стороны. Системные заболевания соединительной ткани представляют собой разнообразную группу состояний, которые сопровождаются нарушением иммунной функции. Это может вызывать повреждение органов из-за воспалительных процессов, дисфункции эндотелия или развития фиброза. Выбор группы сравнения определялся тремя ключевыми факторами: во-первых, это возможная роль гипоксии в патогенезе ЛАГ-ССД, во-вторых, тем фактом, что согласно мировым данным, эта группа самая частая среди ЛАГ-стЗСТ, более того, у пациентов с ЛАГ-ССД часто наблюдается феномен синдрома Рейно, что

затрудняет определение истинной сатурации, тем самым использование методики КР-спектроскопии является наиболее оптимальным вариантом оценки истинной кислород-транспортной функции крови.

Данные литературы однозначно указывают, что легочная артериальная гипертензия, ассоциированная с заболеваниями соединительной ткани, занимает второе место среди причин ЛАГ, составляя примерно 25% всех случаев, уступая лишь ИЛГ, которая встречается почти у 46% пациентов. Примечательно, что ЛАГ-ССД охватывает до 75% всех случаев, демонстрируя доминирующую роль системных заболеваний соединительной ткани в структуре этой патологии [124].

По данным статистике, около 10% пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани, чаще с системной склеродермией, могут столкнуться с легочной артериальной гипертензией на протяжении своей жизни. Пациенты с легочной артериальной гипертензией, связанной с системной склеродермией (ЛАГ-ССД), отличаются стремительно прогрессирующим и зачастую неблагоприятным течением заболевания. Если при ИЛГ удается достичь пятилетней выживаемости, то при ЛАГ-ССД прогноз существенно хуже — медиана выживаемости не превышает 2-3 лет. Для ЛАГ-ССД характерны поздний возраст манифестации, более выраженная сердечно-легочная декомпенсация и крайне низкая эффективность стандартной терапии, что подчеркивает особую природу поражения сосудов и миокарда при системной склеродермии. Добавляет сложности и тот факт, что иммуновоспалительный процесс затрагивает не только мелкие сосуды, но и непосредственно структуру миокарда левого и правого желудочек через внутрисердечное воспаление и диффузный фиброз, а развитие легочной гипертензии усугубляет исходы и ухудшает прогноз [125,126,127].

Анализ результатов собственных исследований, а также данных мировой литературы показывает, что гендерное соотношение ЛАГ-ССД близко к таковому при ИЛГ, где превалирует женский пол. В ходе нашего исследования средний возраст пациентов с ЛАГ-ССД был также достоверно старше, чем у пациентов с ИЛГ. Средний возраст пациентов с ЛАГ-ССД составил 64 [57; 72] года, в свою очередь возраст пациентов с ИЛГ составил 41 [39; 50] год, таким образом группа

ЛАГ-ССД была старше на 23 года. Эти данные соответствуют данными мировой литературы, где средний возраст пациентов с ЛАГ-ССД был старше 45 лет, чем возраст пациентов с ИЛГ [128,129]. По данным Юдкиной Н.Н. в ходе постановки диагноза ЛАГ пациенты с ЛАГ-ССД были в среднем на 15 лет достоверно старше, чем пациенты с ИЛГ [130].

В ходе нашего исследования по оценки функционального статуса больных по данным пройденной Д6МХ в группе ЛАГ-ССД были чуть ниже, чем в группе ИЛГ, однако достоверных различий между группами зафиксировано не было. Эти данные отражают тот факт, что нами была отобрана рафинированная группа пациентов с сопоставимым функциональным классом (ВОЗ) с целью оценки кислород-транспортной функции. Эти данные коррелируют также и с данными Юдкиной Н.Н, где результаты не показали существенных различий в пройденной дистанции. Также по нашим данным показатель Spo2 в группе ЛАГ-ССД были ниже, чем в группе ИЛГ, однако достоверных отличий выявлено не было.

В ходе нашего исследования по результатам клинического анализа уровень гемоглобина при ЛАГ-ССД был чуть ниже, чем у пациентов с ИЛГ, однако достоверных отличий выявлено не было, в свою очередь количество эритроцитов было достоверно ниже в группе ЛАГ-ССД. Согласно ряду работ у пациентов с ЛАГ-ССД выявлено достоверное снижение содержания железа при наличии у них ЛАГ, при том, что уровень гемоглобина у них существенно не отличался. Более того, обсуждался вопрос влияние железа на выживаемость такой категории пациентов [131].

В свою очередь по нашим данным показатель NT-proBNP, который является биомаркером ЛАГ и ХСН, имел достоверную тенденцию к более высоким значениям в группе ЛАГ-ССД, характеризуя более тяжелое течение заболевания в группе ЛАГ-ССД, вышеописанные данные также сопоставимы с данными в работе Юдкиной Н.Н. и зарубежных работах, более того концентрация показателя Д-димера, который также косвенно отражает о наличии воспалительного поражения в нашем исследовании был достоверно выше в группе ЛАГ-ССД.

В ходе проведенного исследования были выявлены особенности ряда гемодинамических показателей. В группе ИЛГ фиксируются более высокие значения СДЛА и ср.ДЛА при сопоставимых показателях СВ и СИ. Показатели ЛСС и ДЗЛА в исследуемых группах также не различалось. Вероятнее всего данные изменение можно трактовать тем фактом, что у пациентов с ЛАГ-ССД менее выражена способность к ремоделированию правых отделов сердца на фоне воспалительных и фибротических изменений характерных для группы ЛАГ-ССД. Вышеописанные данные также коррелируют с данными Юдкиной Н.Н., где показатель ср.ДЛА был выше в группе ИЛГ, однако достоверных различий в показателях СВ и СИ обнаружено не было [130]. Ретроспективное когортное исследование позволило разобраться в патогенетических тонкостях ЛАГ-ССД, выявив, что выраженность кардиальных изменений выходит далеко за пределы классических представлений о легочной гипертензии. У пациентов с ЛАГ-ССД существенно чаще выявляются признаки ремоделирования левого сердца — дилатация предсердия, гипертрофия и диастолическая недостаточность миокарда, что отличает их от пациентов с ИЛГ. Вероятно, именно эти изменения оказываются критическим фактором высокой летальности в группе ЛАГ-ССД, формируя уникальный фенотип течения заболевания. Интересно, что, несмотря на схожий уровень СИ, пациенты с ЛАГ-ССД демонстрировали более низкие значения среднего давления в легочной артерии (46,6 мм рт. ст. против 54,4; P=0,002), что может указывать на самостоятельную роль левожелудочных нарушений в прогнозе даже на фоне умеренной легочной гипертензии [129].

Выявленные различия между группами ИЛГ и ЛАГ-ССД при оценке клинико-функционального и гемодинамического статуса послужили гипотезой о вероятной роли гипоксии с функциональной компрометации больных ЛАГ-ССД, что потребовало проведения разработанной нами методики диагностики состояния пациентов с помощью КР- спектроскопии гемоглобина эритроцитов крови. Нашей задачей было охарактеризовать особенности конформации гемоглобина у пациентов с ИЛГ и ЛАГ -ССД. Доказано, что для пациентов с ЛАГ-ССД характерно более выраженное изменение конформации гема, чем для группы

ИЛГ [121]. Параметр, характеризующий особенности конформации гема за счет колебаний пиррольных полуколец, а также доля оксигемоглобина по отношению ко всему гемоглобину (I_{1375}/I_{1172}) в группе ИЛГ было достоверно выше, чем в группе ЛАГ-ССД, как в цельной крови, так и в СЭ. В свою очередь параметр КР-спектра, характеризующий долю оксигемоглобина к дезоксигемоглобину, сродство гемоглобина к лигандам, а также большую вероятность нахождения гема в куполообразной конформации (I_{1580}/I_{1550}) в группе ИЛГ был достоверно выше, чем в группе ЛАГ-ССД как в цельной крови, так и в СЭ. Стоит отметить, что особенности конформации гема обусловлены и тем, что вклад валентных колебаний винильных групп к симметричным колебаниям пиррольных колец и относительную способность гемоглобина выделять лиганды, в том числе кислород (I_{1580}/I_{1375}), выше в группе ЛАГ-ССД, чем в группе ИЛГ в цельной крови. В выделенном из крови гемоглобине эритроцитов существенных различий между группами ИЛГ и ЛАГ-ССД обнаружено не было, что однозначно намекает на важную роль компонентов плазмы в формировании специфических эффектов. Как интенсивность валентных колебаний аминокислотных остатков глобина (I_{2880}/I_{2930}), так и другие спектральные параметры не отличались, что позволяет предположить: структурные перестройки гемоглобина при патологии зависят не только от внутриклеточных факторов эритроцитов, но и от регуляторных влияний плазмы крови.

Таким образом, впервые выявлено, что для гема гемоглобина эритроцитов крови пациентов группы ЛАГ-ССД характерна особенная, «куполообразная» конформация гема с более выраженным валентными колебаниями винильных групп, и колебаний пиррольных колец гема относительно контроля и ИЛГ.

Итак, нами был выявлен вклад ЛАГ-ССД в нарушение кислород-транспортной функции. Вероятнее всего данные изменения могут быть обусловлены несколькими причинами; при склеродермии отмечаются специфические изменения в микроциркуляции и структурах сосудов, что может приводить к более выраженному повреждению сосудов, более того для данной формы часто характерно наличие фиброза легких, что вызывает дополнительное

ухудшение функции легких и нарушению кислород-транспортной функции. Вышеописанные изменения в легочных сосудах и альвеолах могут также ухудшать обмен кислорода и углекислого газа, в результате даже при нормальной или повышенной вентиляции легких, пациенты с легочной гипертензией могут испытывать недостаток кислорода. Данные факторы в совокупности могут приводить к более выраженному нарушению кислород-транспортной функции в группе ЛАГ-ССД, что заметно ухудшает их общее состояние и качество жизни.

Нами также проводилась оценка динамики изменений конформации гемопорфирина гемоглобина в зависимости от эффективности ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг. Известно, что актуальной проблемой терапии является также изучение влияния ЛАГ-специфической терапии на течение ЛГ, а также оценка эффективности проводимой терапии, поэтому нашей задачей было также изучить динамику изменений конформации гемопорфирина гемоглобина в зависимости от эффективности ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг. Селексипаг – первый в своем роде селективный агонист рецепторов простациклина для перорального применения, рекомендованный для лечения пациентов с ЛАГ [132]. В 2015 году Управление по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) одобрило селексипаг для длительного лечения взрослых с легочной артериальной гипертензией II и III функциональных классов по классификации ВОЗ. Этот препарат может быть назначен как самостоятельно, так и в составе комбинированных схем с антагонистами рецепторов эндотелина и/или ингибиторами фосфодиэстеразы-5. Главные цели терапии — замедлить прогрессирование легочной артериальной гипертензии и снизить число госпитализаций, связанных с обострениями ЛАГ [133]. В России препарат был официально зарегистрирован в 2019 году для пациентов с ЛАГ функциональных классов II–III (по классификации ВОЗ) — для предупреждения прогрессирования заболевания в рамках как монотерапии, так и комплексного подхода.

В ходе нашего исследования было продемонстрировано, что медиана времени от постановки диагноза ЛАГ до назначения селексипага составила 35 [10–69] месяцев, а от первого назначения предшествующей ЛАГ-специфической

терапии до присоединения селексипага - 25 [8,8; 69,]. Согласно предыдущим работ медиана времени от постановки диагноза ЛАГ до назначения селексипага составила 31,0 [7,0; 60,0] месяцев [134]. Эти данные согласуются с результатами зарубежных регистров, указывающих, что наиболее часто селексипаг назначается спустя 36 месяцев после верификации диагноза. В регистре REHAP 26,8 [10,4; 72,0] месяцев [135]. В свою очередь в многоцентровом наблюдательном ретроспективном исследовании RAMRHA время от верификации ЛАГ до начала лечения селексипагом составило 45 месяцев [136].

На фоне назначения селексипага в составе комбинированной ЛАГ-специфической терапии в течение 12 месяцев достигнуто достоверное улучшение в Д6МХ до 445,0 [431,3; 512,0] м и достоверным снижением выраженности одышки по шкале Борга до 3,0 [1,3; 3,0] баллов. По мировым данным прием селексипага характеризовался увеличением в дистанции в Д6МХ по сравнению с исходными данными, чем в группе плацебо, в общей популяции на 26 нед. исследования [107]. Пациенты, которые ранее не получали ЛАГ-специфическую, селексипаг значительно улучшал дистанцию в Д6МХ с медианой различия 34 м по сравнению с группой плацебо [107]. В метаанализе (Chen et al., 2022) по результатам 4 исследований (селексипаг (n=280) или плацебо (n=234) у пациентов наблюдалось среднее улучшение на +34 метра в Д6МХ в сравнении с плацебо [115]. В мета-анализе (Manzi et al., 2023) по результатам 2 исследований (селексипаг (n=607) или плацебо (n=1463) у пациентов наблюдалось среднее улучшение на +15 метров в Д6МХ в сравнении с плацебо [137].

Показатель отражающий прогрессирование сердечной недостаточности, а также отражающий прогноз у пациентов с ЛАГ, а именно NT-proBNP достоверно уменьшился до 242,3 [96,9; 816,3] нг/л, что соответствует динамике NT-proBNP в исследовании GRIPHON: к 26 недели терапии селексипагом его уровень достоверно снизился с 514,5 нг/л до 369,5 нг/л., по сравнению с плацебо [107].

У больных ИЛГ улучшились параметры легочной гемодинамики: выявлен прирост СВ до 4,0 [3,2; 4,7] л/мин, СИ до 2,2 [2,1; 2,6] л/мин/м², а также достоверное снижение ЛСС до 11,2 [9,4; 15,0] единиц Вуда. Получена также достоверная

положительная динамика SvO_2 до 64,5 [60,3; 66,8] %. В ходе клинического исследования II фазы было установлено, что применение селексипага улучшает ряд гемодинамических показателей у пациентов с ЛАГ, которые получали стабильные дозы антагонистов рецепторов эндотелина и/или ингибиторов фосфодиэстеразы-5. В течение 17 недель лечения с подбором дозы селексипага (от 200 до 800 мкг два раза в день) наблюдалось статистически значительное снижение ЛСС на 30,3% по сравнению с группой плацебо. Также было отмечено значительное увеличение сердечного индекса и снижение легочного сосудистого сопротивления, при этом не было выявлено влияния на систолическое или диастолическое артериальное давление и частоту сердечных сокращений, по сравнению с плацебо [138]. В ходе многочисленных исследований было выявлено, что прием селексипага способствует снижению риска смерти и прогрессирования ЛАГ, что подтверждается снижением на 40% риска достижения конечной точки (смерти от любой причины или прогрессирования ЛАГ) по сравнению с группой плацебо [132].

В данной серии экспериментов использование КР- спектроскопию для контроля кислород-транспортной функции крови, контролируя параметр, характеризующий колебание пиррольных полуколец, а также изменения доли оксигемоглобина по отношению ко всему гемоглобину (I_{1375}/I_{1172}) в цельной крови выявило изменения конформации гема только в эритроцитах крови, но не в СЭ. Доказано, что параметр, характеризующий долю оксигемоглобина к дезоксигемоглобину, характеризующий вероятность нахождения гема в куполообразной конформации, а также демонстрирующий сродство гемоглобина к лигандам, в том числе к кислороду (I_{1580}/I_{1550}) был достоверно выше после терапии селексипагом в цельной крови, однако в СЭ достоверно не отличался. В свою очередь, параметр I_{12880}/I_{12930} был достоверно выше как в цельной крови, так в СЭ.

Таким образом, нами впервые было продемонстрировано влияние селексипага на кислород-транспортную функцию. Данные изменения вероятно связаны с влиянием лекарственной терапии, включающей селексипаг, которая приводит к улучшению легочной гемодинамики и дисфункции правого желудочка,

что способствует к дальнейшему улучшению кислородного обмена и метаболической активности тканей.

Кроме того, в задачи нашего исследования также входило оценка комплекс параметров кислород-транспортной функции крови с разработкой способа оценки тяжести состояния пациентов с идиопатической легочной гипертензией с использованием метода КР-спектроскопии.

Таким образом, разработанная методика может быть предложены как еще один способ неинвазивной оценки тяжести состояния, путем исследования кислород-транспортной функции в крови. Как было нами показано ранее, у пациентов с ИЛГ на молекулярном уровне обнаружено особенности в конформации гемопорфирина гемоглобина, которое проявляется в нарушениях функции переноса кислорода в крови.

Очевидно, предлагаемая нами технология диагностики должна сопровождаться дополнительными исследованиями с помощью других методов. Например, ранее уже были попытки определения тяжести течения ЛГ с помощью ЭхоКГ или компьютерной диагностики. В рамках КТ-диагностики измеряли диаметр главной легочной артерии и диаметр грудной клетки на соответствующем уровне среза, после чего рассчитывали два сосудисто-торакальных индекса: СТИ1 — отношение поперечного диаметра грудной клетки на уровне главной легочной артерии к её диаметру, и СТИ2 — аналогичное отношение на уровне бифуркации легочной артерии. Диапазон среднего СТИ от 6,9 до 9,4 указывает на лёгкую степень легочной гипертензии, в то время как значение ниже 6,8 свидетельствует о тяжелой степени заболевания [139]. К недостатком вышеописанного изобретения стоит отнести тот факт, что компьютерная томография является дорогостоящим методом диагностики, а также вызывает лучевую нагрузку, поэтому в нашей описанной методике мы создали эффективный способ оценки тяжести течения ЛГ, который позволяет получать информацию о выраженности гипоксии за короткий промежуток времени независимо от физиологических особенностей пациента, не требует больших вычислительных мощностей для анализа данных.

Заключение

В проведенном нами исследовании у больных с верифицированным диагнозом ИЛГ в результате проведения комплексной оценки и сопоставления ключевых клинико-функциональных и гемодинамических данных с показателями кислород-транспортной функции крови продемонстрирована важная роль выявления особенностей конформации гемоглобина в эритроцитах крови пациента с помощью КР-спектроскопии.

Впервые получены данные о различиях в конформации гема (порфиринового макроцикла) эритроцитов цельной крови и суспензии эритроцитов между группой пациентов с подтвержденной ИЛГ и здоровыми добровольцами. Впервые также продемонстрирован вклад гипоксии в течение легочной гипертензии на молекулярном уровне, основываясь на анализе различных соотношений КР спектров (I_{1375}/I_{1172} , I_{1580}/I_{1375} , I_{1580}/I_{1550} , I_{2880}/I_{2930}), отражающие кислород-транспортную функцию гемоглобина.

Важным результатом было получение данных о различиях в конформации гемопорфирина гемоглобина между пациентами с ИЛГ и пациентами с ЛАГ-ССД. Нами продемонстрировано, что степень тяжести течения ЛАГ-ССД, в том числе обусловлена сниженной кислород-транспортной функцией гемоглобина, в том числе за счет сниженного сродства гемоглобина к кислороду и сниженной способности гемоглобина выделять кислород.

Терапия селексипагом у пациентов с ИЛГ оказывает достоверное положительное влияние не только на комплекс клинико-гемодинамических параметров, таких как Д6МХ, NT-proBNP, СВ, СИ, ЛСС, Svo₂, но также и на функцию переноса кислорода, модифицируя конформацию молекулы гемоглобина.

Впервые выявлено, что при назначении больным ЛАГ, не достигшим целей терапии, селективного агониста простациклиновых рецепторов селексипага, через 12 месяцев приводит к значимому улучшению функциональных и

гемодинамических показателей, а также сродства гемоглобина к кислороду и увеличению нахождения гема в состоянии оксигемоглобина.

Использование КР-спектроскопии продемонстрировало уникальную возможность формирования технологии неинвазивной оценки степени тяжести ИЛГ, используя в качестве «сигнальных параметров» величину соотношения максимумов интенсивностей полос спектра КР - 1550 см⁻¹ и 1580 см⁻¹ (I_{1580}/I_{1550}), характеризующее сродство гема гемоглобина к лигандам, в частности к кислороду, увеличение параметра – позволяет контролировать сродство к кислороду к гемоглобину.

Таким образом, разработанная и внедрённая нами методика КР-спектроскопии эффективна для неинвазивной оценки изменений конформации гемоглобина крови при различных стадиях тяжести исходного статуса больных ИЛГ, так и оценки его динамики в результате проводимой терапии.

Выводы

1. С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния установлено, что в гемоглобине эритроцитов пациентов с идиопатической легочной гипертензией по сравнению с контролем меняется конформация гема: наблюдается «куполообразная конформация» (характерна для дезоксигемоглобина), что может рассматриваться в качестве одной из причин формирования гипоксии.

2. У пациентов с идиопатической легочной гипертензией в отличие от легочной артериальной гипертензии на фоне системной склеродермии при сопоставимом функциональном классе (ВОЗ) и значениях сердечного индекса и легочного сосудистого сопротивления при катетеризации правых отделов сердца наблюдалась достоверно более высокие значения систолического и среднего давления в легочной артерии, что сопровождалось менее выраженными нарушениями кислород-транспортной функции за счет изменений колебаний связей полуколец пиррола в геме (I_{1375}/I_{1172}) и сродства гемоглобина к кислороду (I_{1580}/I_{1550}).

3. Назначение селексипага в составе комбинированной терапии через 12 месяцев привело к приросту в дистанции 6 минутной ходьбы на 40 м, снижению индекса по Боргу на 2 балла, NT-proBNP на 308 пг/мл, улучшению гемодинамического профиля (сердечный индекс, легочное сосудистое сопротивление, насыщенность кислородом венозной крови), что сопровождалось улучшением показателей кислород-транспортной функции за счет изменений конформации гема гемоглобина ($I_{1375}/I_{1172} I_{1580}/I_{1550}$)

4. Применение методики спектроскопии комбинационного рассеяния с использованием величины соотношения I_{1580}/I_{1550} , характеризующей сродство гема гемоглобина к кислороду, позволяет объективизировать мониторинг эффективности терапии и прогноза течения заболевания у пациентов с идиопатической легочной гипертензией.

Практические рекомендации

1. Для оценки тяжести пациентов с ИЛГ и ЛАГ-ССД и определения вклада нарушений кислород-транспортной функции при верификации диагноза и эффективности терапии рекомендуется проведение спектроскопии комбинационного рассеяния.
2. Для оценки эффективности ЛАГ-специфической терапии следует контролировать динамику изменения следующих параметров КР – спектра крови, характеризующих особенности конформации гемоглобина: I_{1375}/I_{1172} , I_{1580}/I_{1550} , I_{1580}/I_{1375}
3. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет определить когорту пациентов с ИЛГ, которым при оценке эффективности терапии требуется обязательное проведение КПОС, при значениях показателя I_{1580}/I_{1550} для цельной крови $< 1,03$ и для суспензии эритроцитов $< 2,63$

Список сокращений

- д-Гб — дезоксигемоглобина
- ВОЗ — всемирная организация здравоохранения
- ДЗЛА — давление заклинивания легочной артерии
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- Д6МХ — дистанция 6-минутной ходьбы
- ГБ — гемоглобин
- Гбмс — мембрanoсвязанный гемоглобин
- Гбцит — цитоплазматический гемоглобин
- ГКР — гигантское комбинационное рассеяние
- КПОС — катетеризации правых отделов сердца
- ЛАГ — легочная артериальная гипертензия
- ЛАГ-ССД — легочная артериальная гипертензия, ассоциированная с системной склеродермией
- ЛСС — легочное сосудистое сопротивление
- о-Гб — оксигемоглобина
- ПЖ — правый желудочек
- ПП — правое предсердие
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- СВ — сердечный выброс
- СВ — сердечный выброс
- СИ — сердечный индекс
- ср.ДЛА — среднего давления в легочной артерии
- СЭ — суспензия эритроцитов
- ССД — системная склеродермия
- ФВД — функция внешнего дыхания
- ФК — функциональный класс
- ЭКГ — электрокардиография

ЭхоКГ — эхокардиография

ЭТ-1 — эндотелин 1

IL — интерлейкин

NO — оксид азота

NT-proBNP — мозговой натрийуретический пептид

Список литературы

1. Авдеев С.Н. Легочная гипертензия, в том числе хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия. Клинические рекомендации 2024 / С.Н. Авдеев, О.Л. Барбараши, З.С. Валиева и др. // Российский кардиологический журнал. – 2024. – Т.29. – №11. – С. 170 – 250.
2. Simonneau G. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension / G. Simonneau, D. Montani, D.S. Celermajer, et al. // European Respiratory Journal. –2019. – V.53. – №1. – P. 1801913.
3. Чазова И.Е. Евразийские клинические рекомендации по диагностике и лечению легочной гипертензии / И.Е. Чазова, Т.В. Мартынюк, З.С. Валиева и др. // Евразийский кардиологический журнал. – 2020. – №1. – С. 78-122.
4. Luneva O.G. Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol / O.G. Luneva, N.A. Brazhe, N.V. Maksimova et al. // Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology. – 2007. – V.14. – №1.– Р. 41–46.
5. Юсипович А.И. Изменения состояния гемоглобина у больных ишемической болезнью сердца и больных с недостаточностью кровообращения / А.И. Юсипович, Н.А. Браже, О.Г. Лунева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – №2. – С. 201-203.
6. Humbert M. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension / M. Humbert, G. Kovacs, M.M. Hoeper et al. // European Heart Journal. – 2022. – V.43. – №38. – P. 3618–3731.
7. Kovacs G. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review / G. Kovacs, A. Berghold, S. Scheidl, et al. // The European Respiratory Journal. – 2009. – V.34. – №4. – P. 888–894.
8. Romberg E. Ueber Sklerose der Lungen arterie/ E. Romberg. // Deutsch Archiv Klin Med. – 1891. – №48. – P. 197–206.

9. De Navasquez S. Right ventricular hypertrophy of unknown origin: so called pulmonary hypertension / De Navasquez S., Forbes J.P., Holling H.E. // British heart journal. – 1940. – №2. – P. 177–188.
10. Беленков Ю.Н. Первичная легочная гипертензия / Ю.Н. Беленков, И.Е. Чазова – М.: Нолидж, 1999.– 141 с.
11. Simonneau G. Clinical classification of pulmonary hypertension / G. Simonneau, N. Galie, L.J. Rubin et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2004. – V.43. – №12 (Suppl S). – P. 5–12.
12. Hoeper M.M. A global view of pulmonary hypertension / M.M. Hoeper, M. Humbert, R. Souza et al. // The Lancet. Respiratory medicine. – 2016. V.4. – №4. – P. 306–322.
13. Leber L. Epidemiology of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: identification of the most accurate estimates from a systematic literature review / L. Leber, A. Beaudet, A. Muller. // Pulmonary circulation. –2021. – V.11. – №1. – P. 1–12.
14. Lau E.M.T. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension / E.M.T. Lau, E. Giannoulatou, D.S. Celermajer et al. // Nature reviews. Cardiology. – 2017. – V.14. – №10. – P. 603–614.
15. Montani D. Screening for pulmonary arterial hypertension in adults carrying a BMPR2 mutation / D. Montani, B.Girerd, X. Jais et al. // The European respiratory journal. – 2020. – V.58. – №1. – P. 1-16.
16. Frost A.E. The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: how REVEAL differs from historic and non-US Contemporary Registries / A.E. Frost, D.B. Badesch, R.J. Barst et al. // Chest. – 2011. – V.139. – №1. – P. 128–137.
17. Авдеев С.Н. Легочная гипертензия, в том числе хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия. Клинические рекомендации 2020 / С.Н. Авдеев., О.Л. Барбараши, А.Е. Баутин и др. // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т.26. – №12. – С. 198–267.
18. Ling Y. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United

- Kingdom and Ireland / Y. Ling, M.K. Johnson, D.G. Kiely et al. // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2012. – V.186. – №8. – P. 790–796.
19. D'Alonzo G.E.. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry / G.E. D'Alonzo, R.J. Barst, V S.M. Ayres et al. // Annals of internal medicine. – 1991. – V.115. – №5. – P. 343–349.
20. Benza R.L. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry / R.L. Benza, D.P. Miller, R.J. Barst et al. // Chest. – 2012. – V.142. – №2. – P. 448–456.
21. Yuan J.X. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits / J.X. Yuan, L.J. Rubin. // Circulation. – 2005. – V.111. – №5. – P. 534–538.
22. Tuder R.M. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension / R.M. Tuder, S.L. Archer, P. Dorfmuller et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2013. – V.62. – №25 (Suppl). – P. 4-12.
23. Мартынюк Т.В. Вклад Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова в изучение проблемы легочной гипертензии / Т.В. Мартынюк. // Кардиологический вестник. – 2018. – Т. 13. – №2. – С.5.
24. Коносова И.Д. Влияние ингаляционного оксида азота и небиволола на клинико-гемодинамический и нейро-гуморальный статус больных с легочной гипертензией различной этиологии: Дисс. ... канд. биол. наук : 03.01.04, 14.01.05 / Коносова Ирина Дмитриевна. – М. – 2015. – 111 с.
25. Dorfmuller P. Inflammation in pulmonary arterial hypertension / P. Dorfmuller, F. Perros, K. Balabanian et al. // European respiratory journal. – 2003. – V.22. – №2. – P. 358–363.
26. Morrell N.W. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension / N.W. Morrell, S. Adnot, S.L. Archer et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2009. – V.54. – №1(Suppl.) – P. 20–31.

27. Чазова И.Е., Мартынюк Т.В. Легочная гипертензия. — Москва. Практика, 2015. — С. 928.
28. Lee S.D.. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension / S.D. Lee, K.R. Shroyer, N.E. Markham et al. // The Journal of clinical investigation. – 1998. – V.101. – №5. – P. 927–934.
29. Sun X.G. Pulmonary function in primary pulmonary hypertension / X.G. Sun, J.E. Hansen, R.J. Oudiz et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2003. – V.41. – № 6. – P. 1028–1035.
30. Hassoun P.M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling / P.M. Hassoun, L. Mounthou, J.A. Barbera et al. // J Journal of the American College of Cardiology. – 2009. – V.54. – №1(Suppl.). – P. 10–19.
31. Humbert M. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension / M. Humbert, G. Monti, F. Brenot et al. // American journal of respiratory and critical care medicine. – 1995. – V.151. – №5. – P. 1628–1631.
32. Soon E. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension / E. Soon, A.M. Holmes, C.M. Treacy et al. // Circulation. – 2010. – V.122. – №9. – P. 920–927.
33. Ryan J.J. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure / J.J. Ryan, S.L. Archer // Circulation research. – 2014. – V.115. – №1. – P. 176–188.
34. Ryan J.J. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension/ J.J. Ryan, J. Huston, S. Kutty et al. // The Canadian journal of cardiology. – 2015. – V.31. – №4. – P. 391– 406.
35. Fang Y.-H. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle / Y.-H. Fang, L. Piao, Z. Hong et al. // Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). – 2012. – V.90. – №1. – P. 31–43.
36. Xu W. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells / W. Xu, T. Koeck, A.R. Lara et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – V.104. – №4. – P. 1342–1347.

37. Mayes M.D. Scleroderma epidemiology / M.D. Mayes. // Rheumatic diseases clinics of North America. – 2003. – V.29. – №2. – P. 239–254.
38. Юдкина Н.Н. Особенности лёгочной артериальной гипертензии, ассоциированной с системной склеродермиею: обзор литературы / Н.Н. Юдкина, А.В. Волков. // Евразийский Кардиологический Журнал. – 2015. – №4. – С. 32–39.
39. Van den Hoogen F. Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An ACR-EULAR Collaborative Initiative / F. van den Hoogen, D. Khanna, J. Fransen et al. // Arthritis and rheumatism. – 2013. – V.72. – №11. – P. 2737–2747.
40. Shah A.A. Telangiectases in scleroderma: a potential clinical marker of pulmonary arterial hypertension / A.A. Shah, F.M. Wigley, L.K. Hummers. // The Journal of rheumatology. – 2010. – V.37. – №1. – P. 98–104.
41. Grigoryev D.N. Identification of candidate genes in scleroderma-related pulmonary arterial hypertension / D.N. Grigoryev, S.C. Mathai, M.R. Fisher et al. // Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine. – 2008. – V.151. – №4. – P. 197–207.
42. Girgis R.E. Long-term outcome of bosentan treatment in idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary arterial hypertension associated with the scleroderma spectrum of disease / R.E. Girgis, S.C. Mathai, J.A/ Krishnan et al. // The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation. – 2005. – V.24. – №10. – P. 1626–1631.
43. Mathai S.C. Tricuspid annular plane systolic excursion is a robust outcome measure in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension / S.C. Mathai, C.T. Sibley, P.R. Forfia, et al. // The Journal of rheumatology. – 2011. – V.38. – №11. – P. 2410–2418.
44. Rich S. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study / S. Rich, D.R. Dantzker, S.M. Ayres, et al. // Annals of internal medicine. – 1987. – V.107. – №2. – P. 216–223.

45. Strange G. Time from symptoms to definitive diagnosis of idiopathic pulmonary arterial hypertension: The delay study / G. Strange, E. Gabbay, F. Kermene, et al. // *Pulmonary circulation.* – 2013. – V.3. – №1. – P. 89–94.
46. Рябыкина Г.В. Электровекторкардиографическая диагностика гипертрофии правого желудочка у больных легочной гипертензией / Г.В. Рябыкина, Е.В. Блинова, Т.А. Сахнова // *Медицинский алфавит.* – 2017. – T.8. – C. 3–17.
47. Kovacs G. Use of ECG and other simple non-invasive tools to assess pulmonary hypertension / G. Kovacs, A. Avian, V. Foris et al. // *PloS one.* – 2016. – V.11. – №12. – P. e0168706.
48. Bonderman D. A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension / D. Bonderman, P. Wexberg, A.M. Martischnig et al. // *The European respiratory journal.* – 2011. – V.37. – №5. – P. 1096–1103.
49. Hoeper M.M. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension / M.M. Hoeper, H.J. Bogaard, R. Condliffe et al. // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2013. – V.62. – №25 (Suppl). – P. 42–50.
50. Mukerjee D. Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis / D. Mukerjee, D. St George, C. Knight et al. // *Rheumatology (Oxford, England).* – 2004. – V.43. – №4. – P. 461–466
51. Torbicki A. Cardiac magnetic resonance in pulmonary arterial hypertension: a step in the right direction / A. Torbicki. // *European heart journal.* – 2007. – V.28. – №10. – P. 1187–1189.
52. Savarese G. Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials / G. Savarese, S. Paolillo, P. Costanzo et al. // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2012. – V.60. – №13. – P. 1192–1201.
53. Gabler N.B. Validation of 6-minute walk distance as a surrogate end point in pulmonary arterial hypertension trials / N.B. Gabler, B. French, B.L. Strom et al. // *Circulation.* – 2012. – V.126. – №3. – P. 349–356.
54. Trip P. Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: patient characteristics and treatment responses / P. Trip, E.J. Nossent,

- F.S. de Man et al. // The European respiratory journal. – 2013. – V.42. – №6. – P. 1575–1585.
55. Hoeper M.M. Prognostic value of blood gas analyses in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension / M.M. Hoeper, M.W. Pletz, H. Golpon et al. // The European respiratory journal. – 2007. – V.29. – №5. – P. 944–950.
56. Holverda S. Cardiopulmonary exercise test characteristics in patients with chronic obstructive pulmonary disease and associated pulmonary hypertension / S. Holverda, H.J. Bogaard, H. Groepenhoff et al. // Respiration. – 2008. – V.76. – № 2. – P. 160–167.
57. Chu J.W. High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension / J.W. Chu, P.N. Kao, J.L. Faul et al. // Chest. – 2002. – V.122. – № 5. – P. 1668–1673.
58. Atkins C.G. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components / C.G. Atkins, K. Buckley, M.W. Blades et al. // Applied Spectroscopy. – 2017. – V.71. – №5. – P. 767–793.
59. Auner G.W. Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis / G.W. Auner, S.K. Koya, C. Huang et al. // Cancer metastasis reviews. – 2018. – V.37. – №4. – P. 691–717.
60. Cui S. Raman spectroscopy and imaging for cancer diagnosis / S. Cui, S. Zhang, S. Yue. // Journal of healthcare engineering. – 2018. – P. 1-11.
61. Ember K.J.I. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review / K.J.I. Ember, M.A. Hoeve, S.L. McAughtrie et al. // NPJ Regenerative medicine. – 2017. – V.2. – №12. – P. 1–10.
62. Pence I. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy / I. Pence, A. Mahadevan-Jansen. // Chemical Society reviews. – 2016. – V.45. – №7. – P. 1958–1979.
63. Lyng F.M. Ali, Discrimination of breast cancer from benign tumours using Raman spectroscopy / F.M. Lyng, D. Traynor, T.N.Q. Nguyen et al. // PLoS One. – 2019. – V.14. – №2. – P. e0212376.

64. Winchester M.W. Application of Raman scattering to the measurement of ligament tension / M.W. Winchester, L.W. Winchester, N.Y. Chou. // Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference. – 2008. – №2008. – P. 3434–3437.
65. Gatin E.G. Raman spectroscopy: in vivo application for bone evaluation in oral reconstructive (regenerative)surgery / E.G. Gatin, P. Nagy, S.-M. Iordache et al. // Diagnostics (Basel, Switzerland). – 2022. – V.12. – №3. – P. 723.
66. Klammlinger G.G. From research to diagnostic application of Raman spectroscopy in neurosciences: past and perspectives / G.G. Klammlinger, K.B.M. Frauenknecht, M. Mittelbronn et al. // Free neuropathology. – 2022. – №3. – P. 3–19.
67. Singh R. Emergence of Raman spectroscopy as a probing tool for theranostics / R. Singh, V. Yadav, A.K. Dhillon et al. // Nanotheranostics. – 2023. – V.7. – №3. – P. 216–235.
68. Zhang Y. Raman spectroscopy: a prospective intraoperative visualization technique for gliomas / Y. Zhang, H. Yu, Y. Li et al. // Frontiers in oncology. – 2022. – №12. – P. 1-13.
69. Zhang S. Molecular fingerprint detection using Raman and infrared spectroscopy Technologies for Cancer Detection: a Progress review / S. Zhang, Y. Qi, S.P.H. Tan et al. // Biosensors. – 2023. – V.13. – №5. – P. 557.
70. Schie I.W. Looking for a perfect match: multimodal combinations of Raman spectroscopy for biomedical applications / I.W. Schie, C. Stiebing, J. Popp. // Journal of biomedical optics. – 2021. – V.26. – №8. – P. 1-18.
71. Tavana B. Determination of drugs in clinical trials: current status and outlook / B. Tavana, A. Chen. // Sensors (Basel). – 2022. – V.22. – №4. – P. 1592.
72. Chrisikou I. Analysis of IV drugs in the hospital workflow by Raman spectroscopy: the case of piperacillin and tazobactam / I. Chrisikou, M. Orkoula, C. Kontoyannis. // Molecules (Basel, Switzerland). – 2021. – V.26. – №19. – P. 5879.

73. Shegebayev Z. Pharmacological properties of four plant species of the genus anabasis, amaranthaceae / Z. Shegebayev, A. Turgumbayeva, U. Datkhayev et al. // Molecules (Basel, Switzerland). – 2023. – V.28. – №11. – P. 4454.
74. Zhao X. Application of transmission Raman spectroscopy in combination with partial least-squares (PLS) for the fast quantification of paracetamol / X. Zhao, N. Wang, M. Zhu et al. // Molecules (Basel, Switzerland). – 2022. – V.27. – №5. – P. 1707.
75. Chung Y.G. Raman spectroscopy detects cardiac allograft rejection with molecular specificity / Y.G. Chung, Q. Tu, D. Cao et al. // Clinical and translational science. – 2009. – V.2. – №3. – P. 206–210.
76. Benevides J.M. Raman spectroscopy of proteins / J.M. Benevides, S.A. Overman, G.J. Thomas. // Current protocols in protein science, Chapter 17. – 2004. – V.33. – №1. – P. 17.8.1–17.8.35.
77. Belkozhayev A.M. Extracellular vesicles, stem cells and the role of miRNAs in neurodegeneration / A.M. Belkozhayev, M. Al-Yozbaki, A. George et al. // Current neuropharmacology. – 2022. – V.20. – №8. – P. 1450–1478.
78. Belkozhayev A. Bioinformatics analysis of the interaction of miRNAs and piRNAs with human mRNA genes having di- and trinucleotide repeats / A. Belkozhayev, R. Niyazova, C. Wilson et al. // Genes. – 2022. – V.13. – №5. – P. 800.
79. Li D. Label-free detection of miRNA using surface-enhanced Raman spectroscopy / D. Li, L. Xia, Q. Zhou et al. // Analytical chemistry. – 2020. – V.92. – №19. – P.12769–12773.
80. Zhou W. Simultaneous surface-enhanced Raman spectroscopy detection of multiplexed MicroRNA biomarkers / W. Zhou, Y.-F. Tian, B.-C. Yin et al. // Analytical chemistry. – 2017. – V.89. – №11. – P. 6120–6128.
81. Ma D. Quantitative detection of exosomal microRNA extracted from human blood based on surface-enhanced Raman scattering / D. Ma, C. Huang, J. Zheng et al. // Biosensors & bioelectronics. – 2018. – №.101. – P. 167–173.
82. Рафальский В.В. Перспективы применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии) в кардиологии

- / Б.В. Рафальский, А.Ю. Зюбин, Е.М. Моисеева и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – Т. 19. – №1. – С. 70–77.
83. Shaklai N. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane / N. Shaklai, J. Yguerabide, H. M. Ranney. // Biochemistry. – 1977. — V.16. – №25. – P. 5593–5597.
84. Naz M. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) using blood serum samples / M. Naz, H. Shafique, M.I. Majeed et al. // RSC advances. – 2024. – V.14. – №40. – P. 29151–29159.
85. El-Said W.A. Ultrasensitive label-free detection of cardiac biomarker myoglobin based on surface-enhanced Raman spectroscopy / W.A. El-Said, D.M. Fouad, S.A. El-Safty. // Sensors and Actuators, B: Chemical. – 2016. – №228. – P. 401–409.
86. Zyubin, A. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment / A. Zyubin, V. Rafalskiy, A. Tcibulnikova et al. // Laser Physics Letters. – 2020. – V.17. – №4. – P. 045601.
87. Allakhverdiev E.S. Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research / E.S. Allakhverdiev, V.V. Khabatova; B.D. Kossalbayev et al. // Cells. – 2022. – V.11. – №3. – P. 1-25.
88. Allakhverdiev E.S. Spectral insights: Navigating the frontiers of biomedical and microbiological exploration with Raman spectroscopy / E.S. Allakhverdiev, B.D. Kossalbayev, A.K. Sadvakasova et al. // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2024. – №252. – P. 1-19.
89. Аллахвердиев Э.С., Слатинская О.В., Родненков О.В., Максимов Г.В., Мартынюк Т.В. «Способ прогнозирования тяжести идиопатической легочной гипертензии». Номер патента на изобретение 2770820. Дата государственной регистрации от 22 апреля 2022 года.
90. Correia N.A. Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: A multivariate study on patients with normal and altered PSA values / N.A. Correia, L.T.A. Batista, R.J.M. Nascimento et al. // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2020. – №204. – P. 111801.

91. Moreira L.P. Raman spectroscopy applied to identify metabolites in urine of physically active subjects / L.P. Moreira, L. Silveira, A.G. da Silva et al. // Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. – 2017. – №176. – P. 92–99.
92. Pinto R. Raman spectroscopy applied to diatoms (microalgae, Bacillariophyta): prospective use in the environmental diagnosis of freshwater ecosystems / R. Pinto, R. Vilarinho, A.P. Carvalho et al. // Water research. – 2021. – №198. – P. 117102.
93. Revin V. V. Study of Erythrocyte Indices, Erythrocyte Morphometric Indicators, and Oxygen-Binding Properties of Hemoglobin Hematoporphyrin Patients with Cardiovascular Diseases / V.V. Revin, A.A. Ushakova, N.V. Gromova et al. // Advances in hematology. – 2017. – V.2017. – №.8964587. – P. 1–9.
94. MacRitchie N. Molecular imaging of atherosclerosis: spotlight on Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering / N. MacRitchie, G. Grassia, J. Noonan et al. // Heart. – 2018. – V.104. – №6. – P. 460-467.
95. Maksimov G.V. Study on conformational changes in hemoglobin protoporphyrin in essential hypertension / G.V. Maksimov, N.V. Maksimova, A.A. Churin et al. // Biochemistry. (Moscow). – 2001. – V. 66. – №3. – P. 295–299.
96. Xie S. Discussion on the comparison of Raman spectroscopy and cardiovascular disease-related imaging techniques and the future applications of Raman technology: a systematic review / S. Xie, F. Han, S. Wang et al. // Lasers in Medical Science. – 2025. – V.40.– №1.– P. 116.
97. Maksimov G.V. Role of viscosity and permeability of the erythrocyte plasma membrane in changes in oxygen-binding properties of hemoglobin during diabetes mellitus / G.V. Maksimov, O.G. Luneva, N.V. Maksimova et al. // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2005. – V.140. – №5. – P. 510–513.
98. Mityanina, V.A. Oxygen-Binding Characteristics of Erythrocyte in Children with Type I Diabetes Mellitus of Different Duration / V.A. Mityanina, E.Yu. Parshina, A.I. Yusipovich et al. // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2012. – V.153 – №4. – P. 508–512.
99. Brazhe N.A. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation / N.A. Brazhe, A.A.

Baizhumanov, E.Yu. Parshina et al. // Human Physiology. – 2014. – V.40. – №7. – P. 804–809.

100. Ivanova S.M. Physical-chemical properties of plasma membrane and function of erythrocytes of cosmonauts after long-term space flight / S.M. Ivanova, N.A. Brazhe, O.G. Luneva et al. // Acta Astronautica. – 2010. – V.24. – №12. – P. 1517–1522.
101. Bryzgalova N.Y. Role of the state of erythrocyte cytoplasm in the change of hemoglobin affinity for oxygen / N.Y. Bryzgalova, N.A. Brazhe, A.I. Yusipovich et al. // Biophysics (Oxford). – 2009. – V.54. – №3. – P. 308–311.
102. Torres Filho I.P. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation / I.P. Torres Filho, J. Terner, R.N. Pittman et al. // Journal of Applied Physiology. – 2008. – V.104. – №6. – P. 1809–1817.
103. Wood B.R. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo* / B.R. Wood, D. McNaughton. // The Journal of Raman Spectroscopy. – 2002. – V.33. – №7. – P. 517–523.
104. Wood B.R. Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes / B.R. Wood, L. Hammer, L. Davis et al. // Journal of biomedical optics. – 2005. – V.10. – №1. – P. 14005.
105. Sahu S.C. Insights into the solution structure of human deoxyhemoglobin in the absence and presence of an allosteric effector / S.C. Sahu, V. Simplaceanu, Q. Gong et al. // Biochemistry. – 2007. – V.46. – №35. – P. 9973–9980.
106. Lang I. Effect of selexipag on long term outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) receiving one, two or no PAH therapies at baseline: results from the GRIPHON study / I. Lang, S. Gaine, N. Galie et al. // European Heart Journal. – 2015. – V.36. – №1(Suppl). – P. 381–382.
107. Sitbon O. Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension / O. Sitbon, R. Channick, K.M. Chin et al. // The New England journal of medicine. – 2015. – V.373. – №26. – P. 2522–2533.
108. Galiè N. Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension / N. Galiè, J.A. Barberà, A.E. Frost et al. // The New England journal of medicine. – V. 373. – №9. – P. 834–844.

109. Galiè N. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial / N. Galiè, L.J. Rubin, M. Hoeper et al. // Lancet. – V. 371. – №9630. – P. 2093–2100.
110. Pulido T. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension / T. Pulido, I. Adzerikho, R.N. Channick et al. // The New England journal of medicine. – V. 369. – №9. – P. 809–818.
111. McLaughlin V.V. Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension / V.V. McLaughlin, R.J. Oudiz, A. Frost et.al // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2006. – V.174. – №11. – P. 1257–1263.
112. Hoeper M.M. Combining inhaled iloprost with bosentan in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension / M.M. Hoeper, H. Leuchte, M. Halank et al. // European Respiratory Journal. – V. 28. – №4. – P. 691–694.
113. McLaughlin V. Bosentan added to sildenafil therapy in patients with pulmonary arterial hypertension / V. McLaughlin, R.N. Channick, H.A. Ghofrani et al. // The European respiratory journal. – V. 46. – №2. – P. 405–413.
114. Oudiz R. Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study / R. Oudiz, B. Brundage, N. Galie et al. // Journal of the American College of Cardiology. – V. 60. – №8. – P. 768–774.
115. Chin K.M. Three- Versus Two-Drug Therapy for Patients With Newly Diagnosed Pulmonary Arterial Hypertension / K.M. Chin, O. Sitbon, M. Doelberg et al. // Journal of the American College of Cardiology. – V. 78. – №14. – P. 1393–1403.
116. Grünig E. Randomized Trial of Macitentan/Tadalafil Single-Tablet Combination Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension / E. Grünig, P. Jansa, F. Fan et al. // Journal of the American College of Cardiology. – V. 84. – №3. – P. 473–484.
117. Ghofrani H.A. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension / H.A. Ghofrani, N. Galiè, F. Grimminger et al. // The New England journal of medicine. – V. 369. – №4. – P. 330–340.

118. Nagai M., Mizusawa N., Kitagawa T., Nagatomo S. A role of heme side-chains of human hemoglobin in its function revealed by circular dichroism and resonance Raman spectroscopy / Nagai, M., Mizusawa, N., Kitagawa, T. et al. – 2018.
119. Слатинская О.В. Исследование конформации и распределения гемоглобина при функционировании эритроцита: Дисс ... канд. биол. наук: 1.5.2 / Слатинская Ольга Вадимовна. – М. – 2023. – 253 с.
120. Аллахвердиев Э.С. Возможности оценки кислород-транспортной функции при идиопатической легочной гипертензии на фоне успешного применения селексипага / Э.С. Аллахвердиев, Е.А. Резухина, О.В. Слатинская и др. // Евразийский кардиологический журнал. – 2023. – №3. – С. 44-52.
121. Аллахвердиев Э.С. Возможности применения спектроскопии комбинационного рассеяния у пациентов с прекапиллярной легочной гипертензией / Э.С. Аллахвердиев, О.В. Слатинская, О.В. Родненков и др. // Технологии живых систем. – 2024. – №4. – С. 35-41.
122. Аллахвердиев Э.С. Оценка эффективности ЛАГ-специфической терапии, включающей селексипаг, у пациентов с идиопатической легочной гипертензией по данным комплексного обследования с использованием метода спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния / Э.С. Аллахвердиев, Е.А. Резухина, О.В. Слатинская и др. // Евразийский кардиологический журнал. – 2023. – №4. – С. 56-63.
123. Vlasov A.V. Raman scattering: from structural biology to medical applications / A.V. Vlasov, N.L. Maliar, S.V. Bazhenov et al. // Crystals. – V.10. – №1. – P. 1–49.
124. Чазова И.Е. Диагностика и лечение легочной гипертензии / И.Е. Чазова, Т.В. Мартынюк и др. // Российские рекомендации. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – № 6. – С.132.
125. Волков А.В. Легочная артериальная гипертензия при системных заболеваниях соединительной ткани / А.В. Волков, Т.В. Мартынюк. // Научно-практическая ревматология. – 2015. – Т.53. – №1. – С. 69–77.
126. Iudici M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: prevalence, incidence and predictive factors in a large multicentric Italian cohort / M. Iudici, V. Codullo, D.

- Giuggioli et al. // Clinical and experimental rheumatology. – 2013. – V.2. – №76 (Suppl.). – P. 31–36.
127. Avouac J. Prevalence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis in european Caucasians and metaanalysis of 5 studies / J. Avouac, P. Airò, C. Meune et al. // The Journal of rheumatology. – 2010. – V.37. – №11. – P. 2290–2298.
128. Юдкина Н.Н. Особенности легочной артериальной гипертензии, ассоциированной с системной склеродермией: обзор литературы / Н.Н. Юдкина, А.В. Волков. // Евразийский Кардиологический Журнал. – 2015. – №6. – С. 32–39.
129. Fernandes C.J.C. Survival of patients with schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era/ C.J.C. Fernandes, B. Piloto, M. Castro et al. The European respiratory journal. – 2018. – V.51. – №11. – P. 1800307.
130. Юдкина Н.Н. Легочная артериальная гипертензия, ассоциированная с системной склеродермией, и идиопатическая легочная гипертензия: сравнительный анализ клинико-демографических особенностей и выживаемости по данным Российского национального регистра / Н.Н. Юдкина, Э.Г. Валеева, И.Н. Таран и др. // Системные гипертензии. – 2016. – Т.13. – №2. – С. 65–72.
131. Ruiter G. Iron deficiency in systemic sclerosis patients with and without pulmonary hypertension / G. Ruiter, I.J. Lansen, F.S. de Man et al. // Rheumatology (Oxford, England). – 2014. – V.53. – №2. – P. 285–292.
132. Ильин Н.В. Новые возможности терапии легочной артериальной гипертензии — первый селективный агонист IP-рецепторов простациклина селексипаг / Н.В. Ильин, К.И. Иванов, Т.В. Мартынюк. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2019. – Т.18. – №6. – С. 80–87.
133. Duggan S.T. A Review in Pulmonary Arterial Hypertension / S.T. Duggan, S.J. Keam, C.B. Burness. // American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions. – 2017. – V.17. – №1. – P. 73–80.
134. Резухина Е.А. Портрет типичного пациента с легочной артериальной гипертензией для назначения агониста простациклиневых рецепторов

селексипага / Е.А. Резухина, О.В. Родненков, Т.В. Мартынюк. // Евразийский Кардиологический Журнал. – 2023. – №1. – С. 94–99.

135. Del Pozo R. Effectiveness and persistence with selexipag in pulmonary arterial hypertension in the real-life setting / R. Del Pozo, I. Blanco, M López-Meseguer et al. // European journal of internal medicine. – 2023. – №111. – P. 140–142.
136. Bravo-Marqués R. Effectiveness of a Prostacyclin IP Receptor Agonist in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension in the Real-world Andalusian Setting: The RAMPHA Study / R. Bravo-Marqués, V. Becerra-Muñoz, F. Espíldora-Hernández et. al. // Clinical therapeutics. – 2024. – V.46. – №6. – P. 509–514.
137. Manzi G. Comparative effectiveness of oral therapies targeting the prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: A systematic review and network meta-analysis / G. Manzi, M.V. Mariani, D. Filomena et al. // International journal of cardiology. – №131691.
138. Simonneau G. Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension / G. Simonneau, A. Torbicki, M.M. Hoeper et al. // The European respiratory journal. – 2012. – V.40. – №4. – P. 874–880.
139. Калачева Т.П., Чернявская Г.М., Белобородова Э.И., Рачковский М.И., Синичева Ю.И., Максименко Г.В. «Способ прогнозирования вероятного наступления летального исхода у больных циррозом печени вирусной, алкогольной и сочетанной этиологии в сочетании с легочной гипертензией». Номер патента 2269931. Дата государственной регистрации от 27 апреля 2009 года.