

Механизм повреждения мелких холангиоцитов при первичном билиарном холангите

В.И. Решетняк, д.м.н., проф., И.В. Маев, д.м.н., проф., академик РАН

Адрес для переписки: Василий Иванович Решетняк, vasilii.reshetnyak@yandex.ru

Для цитирования: Решетняк В.И., Маев И.В. Механизм повреждения мелких холангиоцитов при первичном билиарном холангите. Эффективная фармакотерапия. 2024; 20 (2): 72–84.

DOI 10.33978/2307-3586-2024-20-2-72-84

Первичный билиарный холангит (ПБХ) – это хроническое холестатическое прогрессирующее заболевание печени, относящееся к холангиопатиям. На уровне мелких желчных протоков факторами защиты билиарных эпителиальных клеток (БЭК, холангиоцитов) от цитотоксического действия желчных кислот служит бикарбонат (HCO_3^-). Открытие повышенной активности X-сцепленной микро-РНК 506 (miR-506) в холангиоцитах пациентов с ПБХ приводит к снижению экспрессии и активности InsP_3R_3 и $\text{AE}2$, нарушению секреции HCO_3^- , изменению рН внутри БЭК и в протоках, а также потенциально объясняет преобладание этого заболевания у женщин. Изменение внутри- и внеклеточного рН при ПБХ способствует поступлению и накоплению желчных кислот в холангиоцитах. Внутриклеточное накопление гидрофобных желчных кислот приводит к сольбилизации фосфолипидов и холестерина из мембранных структур и запускает ускоренное старение и апоптоз БЭК с постепенным развитием пролиферации и дуктулопении. Разрушение желчными кислотами мембран митохондрий приводит к высвобождению и деградации пируватдегидрогеназного (ПДГ) комплекса. Наличие липоевой кислоты в E2-субъединице ПДГ приводит к ее модификации желчными кислотами с потерей иммунной толерантности и появлением серологической реактивности этого комплекса. Презентация лимфоцитам иммуномодифицированного E2 ПДГ-комплекса сопровождается стимулированием субпопуляции Т-клеток и специфическим продуцированием антимитохондриальных аутоантител (АМА). ПДГ функционирует в каждой клетке и необходим для превращения пирувата в ацетил-КоА, который включается в цикл Кребса и крайне важен для получения энергии аденозинтрифосфатов (АТФ). Аутоантитела при этом способны реагировать с E2 ПДГ в митохондриях практически любых клеток, что ведет к развитию энергетической недостаточности питания. Обзор посвящен рассмотрению молекулярных механизмов развития повреждений БЭК у пациентов с ПБХ, что позволяет выдвинуть гипотезу, объясняющую механизм повреждения мелких холангиоцитов, возникновения дуктулопении, образования АМА, развития слабости, недомогания и быстрой утомляемости уже в бессимптомной стадии заболевания.

Ключевые слова: первичный билиарный холангит, антимитохондриальные аутоантитела, микро-РНК 506, инозитол-1,4,5-трисфосфатный рецептор 3-го типа, хлор/бикарбонатный анионообменник 2, «билиарный бикарбонатный зонтик», дигидролипоилтрансациетилаза пируватдегидрогеназного комплекса

Введение

Первичный билиарный холангит (ПБХ) – это хроническое холестатическое прогрессирующее заболевание печени, протекающее с деструкцией, некрозом и/или апоптозом эпителия мелких внутريدольковых и септальных желчных протоков, с формированием аутоиммунного компонента, в терминальной стадии которого развивается цирроз печени [1–3]. Первичному билиарному холангиту предшествует длительный бессимптомный период [1, 2]. В это время отсутствуют какие-либо физикальные признаки заболевания. Клинически может проявляться слабостью и недомоганием. Обнаружение в этот период антимитохондриальных аутоантител (АМА) в сыворотке крови в титре 1:40 и выше служит патогномичным маркером развития ПБХ. Тот факт, что АМА обнаруживаются за много месяцев до появления клинических признаков ПБХ, указывает на их первичную патогенетическую роль, а не на вторичное явление, возникающее как следствие холестаза [4, 5]. При этом большинство исследователей подчеркивают отсутствие корреляции титра АМА с активностью и продолжительностью заболевания [4–7]. Раскрытие причин и механизмов повреждения мелких холангиоцитов и механизмов образования АМА может способствовать пониманию патогенеза развития клинических, морфологических, биохимических и иммунологических признаков ПБХ. Антимитохондриальные антитела не являются строго специфичными для ПБХ [4]. Их относят к иммуноглобулинам класса М (IgM), которые реагируют с множеством антигенов в митохондриях, обозначенных как М1–М9 [8]. Высокочувствительными и наиболее часто (> 95%) встречаемыми аутоантителами при ПБХ являются анти-М2 [8]. Доказано, что у пациентов с классическим течением ПБХ антигенные компоненты АМА относятся к дигидролипоилтрансацилазе (Е2-субъединица) пируватдегидрогеназного (ПДГ) комплекса (Е2 ПДГ), который локализуется на внутренней мембране митохондрий [8]. Согласно экспериментальным данным по иммунизации лабораторных животных, Е2 ПДГ в качестве рекомбинантного полипептида приводит к образованию АМА, но не к повреждению холангиоцитов [9]. Это свидетельствует о том, что АМА не являются фактором, запускающим деструкцию билиарных эпителиальных клеток (БЭК, холангиоцитов). До сих пор неясно, каким образом антиген Е2 ПДГ, находясь на внутренней мембране митохондрий, может быть мишенью иммунных эффекторных механизмов. Крайне важно понять, почему в этот процесс вовлечен антиген Е2 ПДГ клеток желчного эпителия, причем расположенного в желчных протоках мелкого и среднего размера [4]. Четкого ответа на эти вопросы до настоящего времени не существует. Ранее обсуждалась теория антигенной мимикрии.

АМА и теория антигенной мимикрии

Пируватдегидрогеназный комплекс у прокариотов имеет структурное сходство с подобным комплексом эукариотов [10]. Было показано, что антитела, полученные из сыворотки пациентов с ПБХ, вступают

в реакцию с дрожжевыми и бактериальными белками [11, 12]. В связи с этим было высказано предположение, что АМА при ПБХ возникают вследствие перекрестной реактивности к экзогенным бактериальным антигенам (антигенная мимикрия) [13, 14] и что заболевание, возможно, имеет бактериальное происхождение [15]. Но никому не удалось найти четких доказательств наличия какого-либо инфекционного агента [4]. Кроме того, при классическом бактериальном антигенном воздействии на организм в первую очередь вырабатываются и повышаются в крови IgM. Спустя три-четыре недели на их место приходят иммуноглобулины G (IgG). IgM при этом могут сохраняться в организме большого до трех месяцев с последующим их снижением. Но при ПБХ уровень АМА, относящихся к IgM, не исчезает и даже не уменьшается на протяжении многолетнего развития заболевания, что в полной мере не объясняет нарушения иммунной системы и не очень укладывается в бактериальную природу антигенов, запускающих выработку АМА. Хотя при продолжительном воздействии тимуснезависимых антигенов синтез IgM может приобрести стабильный характер [16]. Но при этом требуется постоянное наличие тимуснезависимого антигена в организме пациента и снижение иммунотолерантности к нему. Вероятность того, что бактериальный антиген постоянно присутствует в организме пациентов с ПБХ и запускает выработку АМА, невелика [10].

Логичнее предположить, что это антиген собственных тканей организма человека, а именно эпителия желчевыводящих путей. Но тогда для выработки АМА у пациентов с ПБХ необходимо, чтобы Е2 ПДГ стала иммуноизмененным антигеном, покинула митохондрию, холангиоцит и встретила с иммунокомпетентными клетками, которые запустят выработку аутоантител. До настоящего времени остаются неизвестными триггеры и механизмы, запускающие эти процессы в холангиоцитах.

В последнее десятилетие появились научные данные о значении бикарбоната (HCO_3^-) в качестве «защитного зонтика» для холангиоцитов от токсического действия желчных кислот. Показано, что при ПБХ уменьшается выработка HCO_3^- , что приводит к повышенному поступлению желчных кислот в холангиоцит (теория «дырявого бикарбонатного зонтика»). Эти данные позволили нам высказать предположение, что происходящее при этом постепенное накопление желчных кислот в БЭК, уже в асимптоматической стадии ПБХ, может служить пусковым механизмом для повреждения мелких БЭК, развития дуктулопатии, образования АМА и одного из ранних клинических признаков – слабости.

Факторы агрессии и защиты холангиоцитов

Желчь является агрессивной средой для холангиоцитов, выстилающих внутри- и внепеченочные желчные протоки. Наличие в желчи желчных кислот, обладающих мощными детергентными свойствами, способно вызывать повреждение клеточных мембран холангиоцитов. Гидрофобные желчные кислоты проявляют ци-

токсичность ко многим типам клеток [17]. Однако эпителиальные клетки желчных протоков человека в физиологических условиях подвергаются воздействию очень высоких (миллимолярных) концентраций гидрофобных желчных кислот без признаков цитотоксичности [18]. Эта устойчивость подразумевает наличие механизмов, защищающих холангиоциты от токсического воздействия желчных кислот.

Конъюгирование желчных кислот и образование смешанных мицелл с холестерином и фосфолипидами рассматриваются в качестве защитных механизмов уже на уровне гепатоцитов, желчных капилляров и канальцев Геринга [18]. К известным факторам защиты, которые поступают в желчь в процессе ее прохождения по желчным протокам, относят выработку и секрецию муцина и бикарбоната [19]. В физиологических условиях основной функцией холангиоцитов является билиарная секреция HCO_3^- [20]. HCO_3^- вырабатывается холангиоцитами на всем протяжении билиарного дерева. Выработка муциновых гликопротеидов осуществляется перибилиарными железами (ПБЖ, железы желчных протоков) [21]. ПБЖ располагаются в стенке крупных внутри- и внепеченочных желчных протоков и непосредственно связаны с их просветом. Экспериментальные данные указывают на то, что гликокаликс, покрывающий апикальную поверхность мембран холангиоцитов, с гликозилированными муцинами и другими гликансодержащими мембранными гликопротеинами, стабилизирует «билиарный бикарбонатный зонтик», помогая таким образом защитить холангиоциты человека от токсичности желчных кислот [22]. Вырабатываемый ПБЖ муцин защищает холангиоциты только крупных желчных протоков [19]. Исходя из этого, холангиоциты крупных внутри- и внепеченочных желчных протоков имеют двойную защиту: муцин, вырабатываемый ПБЖ, и бикарбонат. Внутридольковые, междольковые и септальные желчные протоки перибилиарных желез не содержат, что сопровождается отсутствием в них муцина [21]. В результате на уровне внутридольковых, междольковых и септальных протоков фактором защиты БЭК служит только HCO_3^- .

В физиологических условиях складывается равновесие между факторами агрессии (желчные кислоты) и защиты (секреция бикарбоната и муцина).

Механизмы защиты холангиоцитов

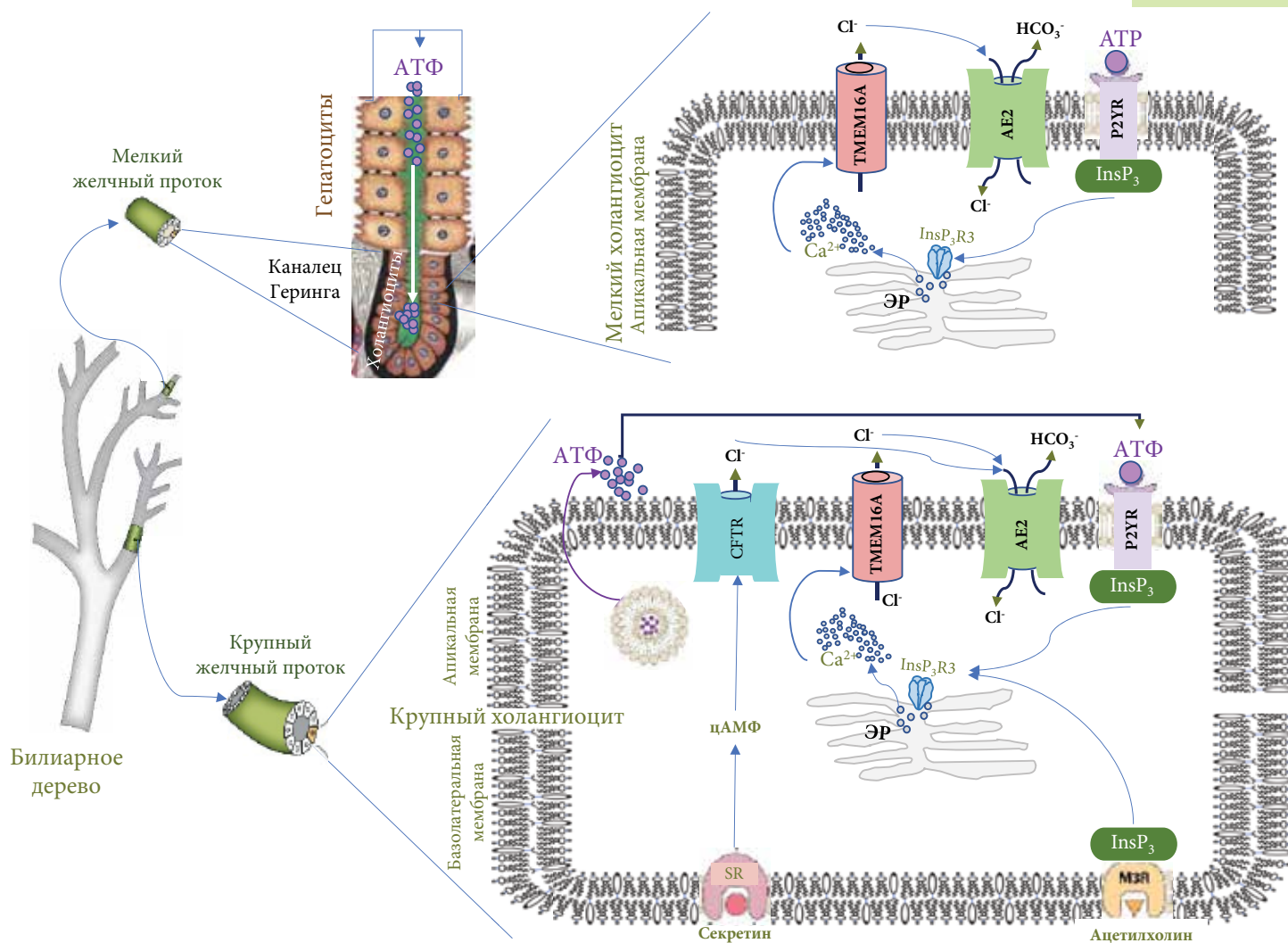
Холангиоциты представляют собой поляризованные эпителиальные клетки, которые выстилают внутри- и внепеченочные желчные протоки, а также отвечают за регулирование объема желчи, модификацию желчи и поддержание pH (щелочности) желчи [23, 24]. Холангиоциты играют важную роль в изменении состава первичной желчи вследствие секреции воды, хлора (Cl^-) и HCO_3^- [25], а также поглощения солей желчных кислот, аминокислот и глюкозы. Выделяют мелкие и крупные холангиоциты в зависимости от их размеров и расположения в мелких и крупных желчных протоках [26]. Они по-разному участвуют в процессах секреции и абсорбции [27]. Секре-

ция HCO_3^- с желчью человека составляет 25–40% от общего объема выделяемой желчи и поддерживает физиологический pH в просвете внутрипеченочных желчных протоков [17, 28, 29].

В процессе желчеобразования в желчный капилляр поступают преимущественно конъюгированные желчные кислоты и минимальное количество неконъюгированных. В физиологических условиях как конъюгированные, так и неконъюгированные желчные кислоты секретируются в желчь гепатоцитами в анионной (депротонированной, ионизированной, имеющей отрицательный заряд) форме [30]. Бикарбонат, секретируемый холангиоцитами в просвет желчного протока, вследствие своих буферных свойств создает слабощелочной pH печеночной желчи. Это поддерживает желчные кислоты в депротонированном состоянии. Ионизированная форма желчных кислот не позволяет им проникать в БЭК в связи с наличием на апикальной поверхности цитоплазматической мембраны холангиоцитов отрицательно заряженных молекул HCO_3^- [30]. Таким образом, секреция бикарбонат-ионов защищает холангиоциты от неконтролируемого трансмембранного поступления желчных кислот, что получило название «билиарный бикарбонатный зонтик» [22]. Последний обеспечивает сохранность холангиоцитов и нормальное желчеотделение по билиарному дереву.

Основные регуляторы выработки и секреции бикарбоната холангиоцитами

Колебания pH в желчных протоках зависят от скорости выработки бикарбоната холангиоцитами. В крупных и малых холангиоцитах сигнальные пути, регулирующие секрецию HCO_3^- , различаются [31]. В малых холангиоцитах активация секреции бикарбоната происходит вследствие билиарного АТФ, секретируемого из вышележащих гепатоцитов канальцев Геринга (рис. 1). Холангиоциты экспрессируют апикальные мембранные белки семейства пуриnergических рецепторов (P2YR), которые стимулируются аденозинтрифосфатами (АТФ) [32]. Люминальный АТФ мелких желчных протоков связывается с P2YR, стимулируя внутриклеточное высвобождение ионов Ca^{2+} через инозитол-1,4,5-трисфосфатный рецептор третьего типа ($\text{InsP}_3\text{R3}$, ITPR3) [33]. В холангиоцитах $\text{InsP}_3\text{R3}$ является основной изоформой рецептора, которая локализуется в апикальной области [31, 34] и участвует в $\text{InsP}_3\text{R3}$ -опосредованной передаче сигналов в клетке и секреции Ca^{2+} [35]. $\text{InsP}_3\text{R3}$ являются единственными рецепторами, способствующими открытию внутриклеточных кальциевых каналов и высвобождению ионов кальция [34]. Кальций является одним из мессенджеров в холангиоците, который модулирует и регулирует такие разнообразные функции клеток, как активация ионных каналов, секреция, клеточная пролиферация, апоптоз и др. [34, 36]. Высвобождение Ca^{2+} из субапикальных запасов в эндоплазматическом ретикулуме запускает и локально активирует трансмембранные 16A хлоридные (Cl^-) каналы (TMEM16A) на апикальной мем-



Примечание. AE2 – хлор/карбонатный ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) анионообменник 2 (chloride/bicarbonate anion exchanger 2); TMEM16A – трансмембранный 16A хлоридный (Cl^-) канал (transmembrane 16A chloride channels); ATP – аденозинтрифосфат; P2Y – мембранный белок семейства пуринергических рецепторов (purinergic receptor family); InsP_3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат (inositol-1,4,5-trisphosphate); $\text{InsP}_3\text{R3}$ – инозитол-1,4,5-трисфосфатный рецептор третьего типа (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 3); ЭР – эндоплазматический ретикулум; SR – рецептор секретина; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; CFTR – регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); M3R – мускариновый рецептор ацетилхолина (muscarinic acetylcholine M3 receptor); HCO_3^- – бикарбонат; Cl^- – хлор; Ca^{2+} – кальций.

Рис. 1. Схема секреции бикарбоната мелкими и крупными холангиоцитами

бране холангиоцитов (рис. 1) [36–38]. Возникающий градиент концентрации Cl^- на апикальной мембране активирует хлор/карбонатный ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) анионообменник 2 (AE2, также Slc4A2), что приводит к секреции HCO_3^- в просвет желчного протока.

В крупных холангиоцитах, кроме Ca^{2+} -зависимого пути секреции бикарбоната, существует дополнительный механизм, функционирующий с участием гормонов секретина и соматостатина [39] (рис. 1). Секретин вырабатывается S-клетками слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и стимулирует выработку HCO_3^- не только слизистой оболочкой самой кишки, но и холангиоцитами, а также эпителиальными клетками протоков поджелудочной железы [39]. Секретин регулирует секрецию крупными холангиоцитами HCO_3^- и Cl^- в желчь посредством взаимодействия с рецепторами секретина (SRs),

расположенными на базолатеральной мембране БЭК [39–42] (рис. 1).

В результате такого взаимодействия через G-белок стимулируется образование циклического АМФ (цАМФ). Последний через аденилатциклазу (AC) активирует регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), вызывая секрецию ионов Cl^- в желчный проток [28]. Возникающий градиент концентрации Cl^- на апикальной мембране холангиоцита активирует хлор/карбонатный анионообменник 2, что приводит к секреции HCO_3^- в просвет желчного протока взамен на внутриклеточное поступление ионов Cl^- в холангиоцит [20, 24, 26, 43]. Параллельно происходит поступление АТФ из холангиоцита в просвет желчного протока вследствие экзоцитоза, что стимулирует секрецию HCO_3^- по Ca^{2+} -зависимому механизму [44].

Рецепторы к секретину и регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) не обнаруживаются в малых холангиоцитах. Поэтому секретин не способен стимулировать в малых холангиоцитах секрецию и поступление в желчь HCO_3^- и Cl^- [24]. При этом сигнальный Ca^{2+} -зависимый механизм секреции бикарбоната присутствует как в малых, так и в крупных типах холангиоцитов (рис. 1) [20, 24].

Соматостатин, связываясь с рецептором соматостатина (SSTR), противодействует стимулирующему действию секретина, ингибирует секрецию жидкости, тормозит выработку и поступление HCO_3^- из холангиоцитов в просвет желчного протока [45].

Механизмы протонирования-депротонирования желчных кислот и проникновения в холангиоциты

Неконтролируемое, независимое от переносчиков, пассивное диффундирование внутрь БЭК неконъюгированных первичных желчных кислот определяется их полярностью и степенью протонирования [18, 46, 47]. Протонирование желчных кислот является экспоненциальной функцией от pH. При закислении pH печеночной желчи желчные кислоты могут подвергаться протонированию. Степень протонирования желчных кислот зависит как от их константы диссоциации (pKa), так и от pH желчи. Значения pKa для неконъюгированных первичных желчных кислот составляют 5–6 [48–50]. Конъюгация первичных желчных кислот с аминокислотами снижает pKa до значений 4–5 для конъюгатов с глицином и до 1–2 – для конъюгатов с таурином, что улучшает их растворимость в воде и снижает липофильность [48–50]. Низкие значения pKa тауриновых конъюгатов первичных желчных кислот свидетельствуют о том, что они являются более сильными кислотами, чем глициновые конъюгаты. Поэтому конъюгированные с таурином желчные кислоты будут находиться в диссоциированной (депротонированной) форме даже при кислых значениях pH желчи, в то время как глициновые конъюгаты, с более высокими значениями pKa, являются слабыми кислотами и при малейшем закислении желчи будут быстро переходить в протонированное состояние [50].

Ионизированные (депротонированные, имеющие отрицательный заряд) желчные кислоты не способны преодолевать «бикарбонатный зонтик» на внешней лепестке апикальной цитоплазматической мембраны холангиоцитов [18, 47]. В норме незначительное количество неконъюгированных протонированных первичных желчных кислот попадает в холангиоцит. Нейтральный внутриклеточный pH способствует транспортировке неконъюгированных протонированных первичных желчных кислот далее в периваскулярное сосудистое сплетение с последующим возвращением в гепатоциты и повторным выделением в желчные капилляры [51]. Такой желчнопеченочный шунт направлен на предотвращение накопления в холангиоцитах токсичных, обладающих сильными детергентными свойствами желчных кислот [18, 47].

Конъюгированные желчные кислоты могут транспортироваться через апикальную и базолатеральную

мембраны холангиоцитов с помощью специфических транспортеров [26, 52–56].

Конъюгаты желчных кислот с глицином в печеночной желчи человека составляют 3/4 всех конъюгированных желчных кислот и имеют значение pKa, близкое к 4 [57]. При физиологическом pH 7,4 глициновые конъюгаты первичных желчных кислот, являясь относительно слабыми кислотами, будут частично протонированы (станут неполярными), что способствует их проникновению в микромолярных количествах в холангиоциты. Небольшое смещение локального pH в кислую среду в желчевыводящих протоках приведет к увеличению количества протонированных глициновых конъюгатов первичных желчных кислот. Существенное увеличение соотношения протонированных: депротонированных конъюгированных с глицином желчных кислот приведет к повышенному поступлению их в холангиоциты.

Конъюгаты желчных кислот с таурином в печеночной желчи составляют 1/4 часть всех конъюгированных желчных кислот. Они являются более сильными кислотами и имеют pKa 1–2 [57, 58], поэтому изменения pH желчевыводящих путей будут слабо влиять на их протонирование. Большая часть тауриновых конъюгатов желчных кислот будет находиться в анионной форме и не сможет поступать в холангиоциты. В связи с этим тауриновые конъюгаты первичных желчных кислот обладают меньшей токсичностью для холангиоцитов.

Активное функционирование транспортеров желчных кислот в базолатеральной мембране холангиоцита, как правило, приводит к быстрому выведению гидрофобных желчных кислот из внутриклеточного пространства и обратной доставке их в гепатоциты [59], поэтому накопление токсичных, обладающих детергентными свойствами желчных кислот в холангиоците в норме не происходит.

Теория «дырявого бикарбонатного зонтика» при ПБХ

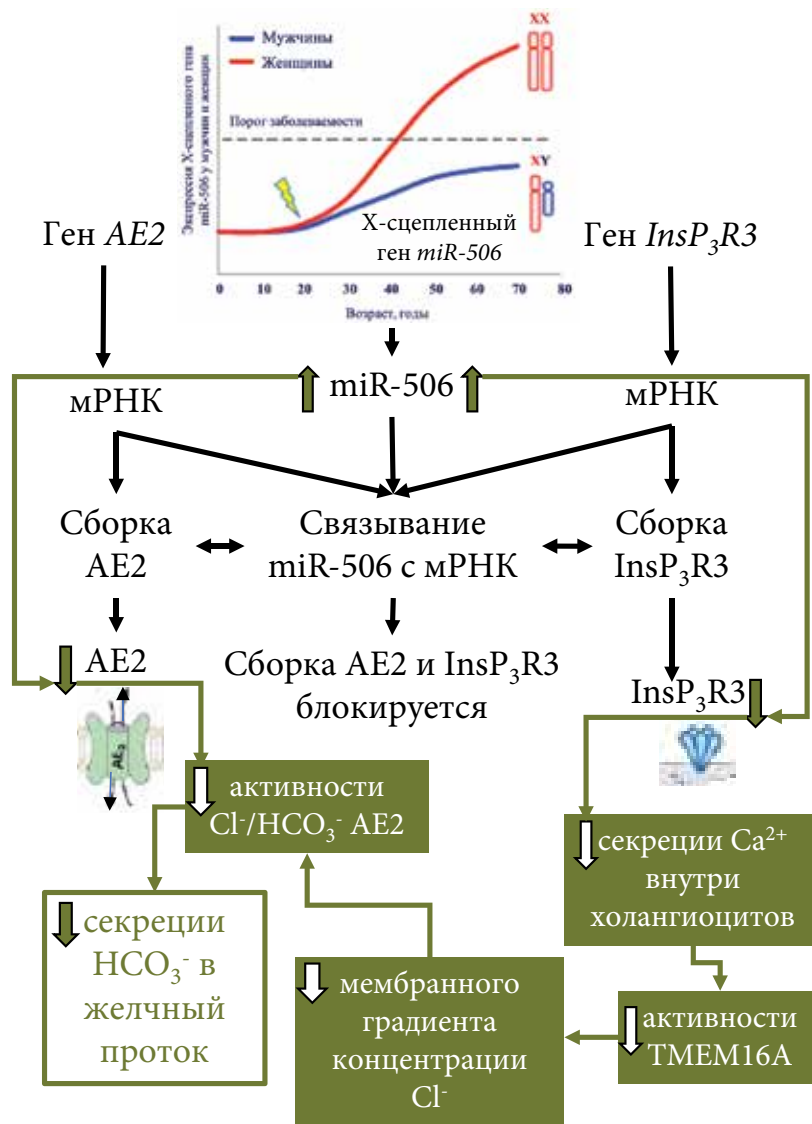
Исследования последнего десятилетия показывают снижение защитной роли бикарбоната при ПБХ. Активно обсуждается теория «дырявого бикарбонатного зонтика» [1, 17, 22]. Эта теория основана на ряде клинических и экспериментальных работ, показывающих недостаточное поступление HCO_3^- в желчные протоки при ПБХ, что приводит к смещению pH внутрипротоковой (печеночной) желчи в слабокислую область, а pH внутри холангиоцита – в слабощелочную область. Причины недостаточной выработки HCO_3^- холангиоцитами до настоящего времени остаются неизвестными. Обсуждается вовлеченность в этот процесс рецепторов $\text{InsP}_3\text{R3}$ (ITPR3) и анионообменника AE2. Показано, что в биоптатах печени и мононуклеарных клетках крови пациентов с ПБХ снижена экспрессия генов $\text{InsP}_3\text{R3}$ и AE2, что свидетельствует об их дисфункции и вовлечении в патогенез этого заболевания [60, 61]. Снижение активности $\text{InsP}_3\text{R3}$ и AE2, а также нарушение их секреторной функции связывают с микро-РНК 506 (miR-506) [62]. Микро-РНК представляют собой небольшие неко-

дирующие РНК длиной 22–23 нуклеотида, которые ингибируют экспрессию генов путем полного или частичного спаривания с начальными последовательностями, расположенными в 3'-нетранслируемых областях (3'-UTR) мРНК [62].

Области 3'-UTR мРНК $InsP_3R$ -3 [62] и 3'UTR мРНК AE2 [63] содержат сайты связывания для miRNA-506. Последняя, связываясь с 3'UTR-областью мРНК $InsP_3R$ и 3'UTR мРНК AE2, предотвращает трансляцию этих белков. Вследствие этого miR-506 является регулятором экспрессии $InsP_3R$ и AE2 (рис. 2). Экспрессия miR-506, вероятно, подвержена эпигенетической регуляции и может варьировать у разных индивидуумов в результате полиморфизмов в сигнальном пути NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор каппа – усилитель легкой цепи активированных В-клеток) [30].

В холангиоцитах пациентов с ПБХ отмечается повышение количества и активности miR-506 [63]. Открытие повышенной активности X-сцепленной miR-506 в холангиоцитах пациентов с ПБХ приводит к снижению экспрессии и активности $InsP_3R$ и AE2, а также потенциально объясняет преобладание этого заболевания у женщин [30] (рис. 2).

Снижение экспрессии и активности $InsP_3R$ в холангиоцитах при ПБХ [64] ухудшает внутриклеточную секрецию ионов Ca^{2+} и использование его в качестве мессенджера в передаче сигналов на трансмембранный Cl канал TMEM16A [44]. О нарушении передачи сигналов Ca^{2+} в холангиоцитах при ПБХ свидетельствуют данные об отсутствии АТФ-стимуляции пуриnergических рецепторов (P2YR) на апикальной мембране [36]. Снижение кальций-зависимой активности TMEM16A на апикальной мембране холангиоцитов приводит к уменьшению секреции ионов Cl⁻ в просвет желчных протоков, что сопровождается снижением активности хлор/бикарбонатного анионообменника 2 и нарушением секреции HCO_3^- БЭК. В моделях холангиоцитов, экспрессирующих miRNA-506, показано опосредованное $InsP_3R$ уменьшение внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} и снижение секреции жидкости и HCO_3^- в желчные протоки [36, 44]. Связывание miR-506 с 3'UTR мРНК AE2 также способствует снижению активности хлор/бикарбонатного анионообменника и уменьшению секреции HCO_3^- холангиоцитами (рис. 2). Холангиоциты человека, выделенные из биоптатов пациентов с ПБХ, показывают снижение активности AE2 [65]. Вследствие этого гомеостаз внутриклеточного pH (pHi) в холангиоцитах и pH в желчных протоках у пациентов с ПБХ может подвергаться изменению [30]. Изменения внутри- и внеклеточного pH при ПБХ, связанные с потерей $InsP_3R$ и снижением активности AE2, способствуют протонированию желчных кислот, поступлению их в холангиоциты и развитию повреждения последних [44]. Деструкция билиарного эпителия мелких внутрипеченочных желчных протоков уже на ранней асимптоматической стадии ПБХ, вероятнее всего, связана с дисбалансом между факторами агрессии (желчными кислотами) и факторами защиты («бикарбонат-



Примечание. $InsP_3R$ – инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор третьего типа; AE2 – хлор/карбонатный анионообменник 2; miR-506 – микроРНК 506; TMEM16A – трансмембранный 16A хлоридный (Cl⁻) канал; HCO_3^- – бикарбонат; Cl⁻ – хлор.

Рис. 2. Механизм уменьшения экспрессии гена $InsP_3R$ и AE2 вследствие увеличения количества miR-506 и повышения ее активности

ный зонтик») холангиоцитов. Так как внутридольковые, междольковые и септальные желчные протоки, которые повреждаются при ПБХ, не содержат перибиллярные железы, вырабатывающие муциновые гликопротеины [21], этот механизм защиты малых холангиоцитов (муциновый надэпителиальный слой), вероятнее всего, не играет патогенетической роли в развитии ПБХ.

Механизм повреждения холангиоцитов при «дырявом бикарбонатном зонтике»

Уменьшение поступления HCO_3^- в желчные протоки вследствие снижения активности $InsP_3R$ и AE2 будет смещать pH в просвете желчного протока в кислую среду [66]. Одновременно с этим из-за задержки

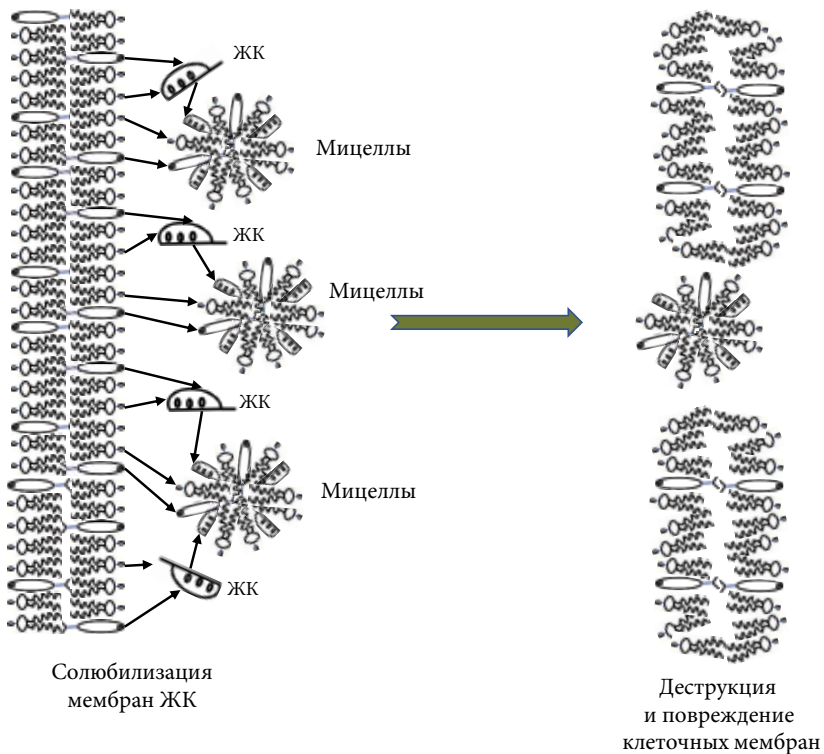


Рис. 3. Солюбилизация желчными кислотами (ЖК) фосфолипидов и холестерина из мембранных структур

и накопления HCO_3^- в цитозоле холангиоцитов будет происходить постепенное защелачивание внутриклеточного рН у пациентов с ПБХ [30, 65, 67]. Полный дефицит АЕ2 приведет к внутриклеточному алкалозу холангиоцитов [61], но у пациентов с ПБХ наблюдается снижение (а не отсутствие) экспрессии генов *InsP₃R3* и *АЕ2* [61].

Смещение рН в слабокислую область в просвете желчных протоков увеличит количество протонированных неконъюгированных и конъюгированных с глицином первичных желчных кислот. Это приведет к повышенному поступлению их в малые (внутридольковые, междольковые, септальные) холангиоциты желчных протоков. Попадая в слабощелочное рН внутри холангиоцитов, протонированные желчные кислоты будут подвергаться депротонированию. Защелачивание рН и ионизация конъюгированных с глицином и неконъюгированных первичных желчных кислот внутри холангиоцитов снижают процесс их диффузии из внутриклеточного в перибиллярное пространство. В результате происходит задержка и постепенное накопление конъюгированных с глицином и неконъюгированных первичных желчных кислот в малых холангиоцитах. Теория «дырявого бикарбонатного зонтика» позволяет объяснить внутриклеточное неконтролируемое повышенное проникновение и накопление желчных кислот в малых БЭК. Наличие на апикальной поверхности крупных холангиоцитов муцинсодержащего гликокаликсного слоя защищает их от проникновения и повреждающего

действия протонированных конъюгированных и неконъюгированных желчных кислот.

Внутриклеточное накопление гидрофобных желчных кислот является предпосылкой для их цитотоксических эффектов [68]. Являясь сильными детергентами, они способны солюбилизовать фосфолипиды и холестерин из мембранных структур холангиоцитов, что приводит к повреждению и деструкции цитоплазматической мембраны и мембран клеточных органелл (рис. 3). При этом попадание и накопление в малых холангиоцитах неконъюгированных желчных кислот, обладающих более сильными детергентными свойствами, является более токсичным для клетки, чем накопление конъюгированных желчных кислот.

Хроническое повреждающее действие желчных кислот на мембранные структуры запускает ускоренное старение, некроз и/или апоптоз БЭК [69]. Происходит разрушение желчными кислотами мембран клеточных органелл и ядерной мембраны в холангиоцитах с выходом апоптогенных факторов. Нарушается барьерная функция желчного эпителия, что приводит к сопутствующему повреждению, воспалению и окислительному стрессу. Цитокины, хемокины и провоспалительные медиаторы, высвобождаемые холангиоцитом, вероятно, стимулируют апоптотические и пролиферативные реакции, активируют фиброгенез [70]. Желчные кислоты также опосредуют свои токсические, апоптотические эффекты через специфические сигнальные пути на внутриклеточном уровне. Активируется внутренний апоптотический путь, включающий митохондриальную транслокацию BAX (BCL2-associated X protein), высвобождение цитохрома С из митохондрий, активацию каспазы 3, расщепление PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) и фрагментацию ДНК [71]. Имеются данные, что miRNA-506 активирует путь апоптоза при стимуляции токсичными желчными кислотами [66]. Провоспалительные цитокины дополнительно увеличивают экспрессию miR-506 [30]. Развивается порочный круг, который поддерживает старение, апоптоз и пролиферацию холангиоцитов, а в конечном счете – дуктулопению [30]. Все это отражает прямое воздействие желчных кислот на холангиоциты, а не на неспецифические эффекты, возникающие в результате перипортального воспаления [31].

С патофизиологической точки зрения общим для всех холангиопатий является сосуществование гибели и пролиферации холангиоцитов, а также различных степеней портального воспаления и фиброза [70]. Гибель клеток индуцирует активацию воспалительных и профиброгенных путей, которые запускают развитие и прогрессирование фиброза, что постепенно приводит к развитию дуктулопении мелких желчных протоков [72]. Концептуальные механизмы развития этих процессов описаны в обзорах [69, 72].

Нарушение апоптоза считается триггером ПБХ и уже в асимптоматической стадии приводит к развитию дуктулопении мелких желчных протоков, одного из ранних морфологических признаков заболевания [73].

Апоптоз зависит от пермеабиллизации митохондрий, связанной с избыточным внутриклеточным накоплением желчных кислот [74–76]. Кроме того, желчные кислоты и неполный апоптоз БЭК, перенаправленный в некроз, могут приводить к патогенному воздействию на внутриклеточные компоненты с последующей генерацией АМА [77].

Механизм пермеабиллизации митохондрий и образования АМА

Солюбилизация желчными кислотами фосфолипидов и холестерина с внешней мембраны митохондрий приводит к нарушению их проницаемости (пермеабиллизации) [78]. Происходит увеличение проницаемости внешней мембраны митохондрий для ионов и растворов [71, 78], возникает утечка содержимого межмембранного пространства в цитозоль и потеря мембранного потенциала, происходят набухание митохондрий, разрыв их внешней мембраны и выход апоптогенных факторов [78]. Открывается внутренняя митохондриальная мембрана, основная мишень для образования АМА. Дальнейшая деструкция митохондрий и солюбилизация желчными кислотами фосфолипидов и холестерина с их внутренней мембраны могут приводить к высвобождению и деградации пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ). Последний включает в себя три фермента: пируватдегидрогеназу (Е1 ПДГ), дигидролипоилтрансацилазу (Е2 ПДГ) и дигидролипоилдегидрогеназу (Е3 ПДГ) [73]. Каждый из этих ферментов, кроме белковой части, имеет кофакторы: Е1 ПДГ в качестве кофактора содержит тиаминпирофосфат, Е2 ПДГ – липоевую кислоту и коэнзим А, Е3 ПДГ – ФАД и НАД. Е1 ПДГ и Е3 ПДГ являются белковыми комплексами, которые не содержат липидных компонентов, поэтому отсутствует вероятность влияния на них накопившихся в холангиоците желчных кислот, воздействующих на липидные компоненты. Сыворотки пациентов с ПБХ не проявляют серологически определяемой реактивности против Е1- и Е3-компонентов ПДГ [79].

Е2 ПДГ является липопротеидом и имеет два сайта связывания липоевой кислоты [8]. Е2 ПДГ содержит незаменимый остаток лизина в липоильном домене, к которому ковалентно присоединена липоевая кислота [8]. Липоево-лизиновая связь в положении 173 высоко консервативна у разных видов и необходима для распознавания антигена [80]. АМА нацелены на иммунодоминантные эпитопы, содержащие липоевую кислоту.

Ранее было показано значение химических ксенобиотиков, способных модифицировать липоевую кислоту в Е2 ПДГ, для появления серологической реактивности этого комплекса [81, 82]. Изменение конформационной структуры липоильного домена Е2 ПДГ вследствие химической модификации липоевой кислоты может способствовать потере иммунной толерантности [83, 84]. Вероятнее всего, такими химическими модификаторами при ПБХ выступают желчные кислоты, накапливающиеся в холангиоцитах при потере защитных свойств «бикарбонатного зонтика». Желчные кислоты, обладающие мощными детергентными свой-

вами, могут взаимодействовать с липоевой кислотой антигенраспознаваемого участка Е2 ПДГ. Результатом такого взаимодействия может быть иммуномодификация Е2 ПДГ-комплекса с приобретением аутоантигенных свойств и потерей иммунной толерантности [66]. Подтверждением этого предположения служат ряд исследований, выполненных в конце прошлого столетия. В этих работах было показано, что основная иммуногенная область на Е2 ПДГ, распознаваемая сыворотками от пациентов с ПБХ, локализована в липоилсодержащем домене [85–87]. При этом считается, что содержание липоевой кислоты в Е2 ПДГ играет роль мощного адьюванта [88]. Презентация лимфоцитам иммуномодифицированного Е2 ПДГ-комплекса может привести к стимулированию субпопуляции Т-клеток и специфическому продуцированию АМА [66, 88, 89].

«Дырявый бикарбонатный зонтик» запускает постоянный и бесконечный процесс накопления и детергентного воздействия желчных кислот на малые холангиоциты с образованием АМА. Так как нарушение поступления бикарбоната в просвет желчного протока является постоянным, то и выработка АМА будет непрерывной. В результате в плазме крови больных ПБХ будет постоянно поддерживаться повышенный уровень IgM (M2).

Появление АМА в сыворотке крови является еще одним ранним иммунологическим патогномичным признаком ПБХ, который появляется уже в асимптоматической стадии заболевания.

Дисфункция ПДГ-комплекса и первые клинические признаки асимптоматической стадии ПБХ

Детекция АМА в асимптоматической стадии заболевания сопровождается появлением первых субъективных клинических признаков: слабость, недомогание, усталость, снижение работоспособности [90]. Усталость является наиболее распространенным симптомом ПБХ в асимптоматической и ранней стадии заболевания [91–93]. Сообщается, что около 40–80% пациентов сталкиваются с усталостью в качестве симптома ПБХ [94, 95], однако нет никакой корреляции между усталостью и тяжестью или продолжительностью заболевания [95–98]. Механизм развития усталости тесно связан с постепенно прогрессирующей энергетической недостаточностью [99]. Последняя скорее всего связана с вовлечением пируватдегидрогеназного комплекса в патологический процесс развития ПБХ. Комплекс пируватдегидрогеназы является очень важным метаболическим ферментом. ПДГ функционирует в каждой клетке и необходим для превращения пирувата в ацетил-КоА, который включается в цикл Кребса и крайне важен для получения организмом энергии в форме АТФ [73]. По мере пермеабиллизации митохондрий в холангиоцитах и вовлечения ПДГ в выработку АМА происходит постепенное и постоянное снижение синтеза АТФ. Это приводит к развитию локальной энергетической недостаточности, что, в свою очередь, способствует усилению процессов старения и апоптоза мелких

ЭТИОЛОГИЯ ПБХ НЕИЗВЕСТНА

первоначальный триггер заболевания индуцирует X-сцепленное эпигенетическое увеличение активности miR-506



Примечание. InsP₃R3 – инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор третьего типа; AE2 – хлор/карбонатный анионообменник 2; E2 ПДГ – дигидролипоилтрансацилаза пируватдегидрогеназного комплекса; АТФ – аденозинтрифосфат.

Рис. 4. Механизм образования антимитохондриальных антител, развития дуктулопении, слабости и недомогания в асимптоматической стадии первичного билиарного холангита: гипотеза

БЭК, инициированных желчными кислотами. Возникает порочный замкнутый круг, способствующий прогрессированию дуктулопении и образованию АМА. Аутоантитела при этом способны реагировать с полипептидами, относящимися к E2 ПДГ, в митохондриях практически любых клеток. Показано, что антитела к ПБХ перекрестно реагируют с полипептидами в митохондриях говяжьего сердца, предположительно относящимися к E2 ПДГ [100]. Происходит снижение выработки АТФ и развитие энергетической недостаточности во всем организме. Развитие энергетической недостаточности сопровождается повышением гликогенолиза и снижением гликогеногенеза. Представленные J.N. Green и соавт. данные указывают на то, что уже на начальных стадиях ПБХ в печени постепенно происходит снижение запасов гликогена, связанное с повышением гликогенолиза и снижением гликогеногенеза [101]. Авторы убедительно показали, что у пациентов с ПБХ значительно (вплоть до нуля) падает активность глюкокиназы, что свидетельствует о снижении образования гликогена в печени [101]. При этом гексокиназа (производит фосфорилирование гексоз), отвечающая за синтез гликогена преимущественно в мышцах, у пациентов с ПБХ в этот период достоверно увеличивается по сравнению со здоровыми лицами [101].

В результате развивающейся энергетической недостаточности в асимптоматической стадии заболевания появляются первые клинические признаки выраженной слабости, быстрой утомляемости, снижения работоспособности, функционального статуса и качества жизни пациентов с ПБХ [90, 102–104].

Заключение

Растущий объем знаний о молекулярных механизмах развития поврежденных хolangиоцитов у пациентов с ПБХ позволяет выдвинуть гипотезу, объясняющую патогенез возникновения первых морфологических (дуктулопения), иммунологических (АМА) и клинических (слабость, недомогание, быструю утомляемость) признаков заболевания в асимптоматической стадии [105] (рис. 4).

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что у восприимчивых индивидуумов первоначальный неизвестный триггер вызывает X-сцепленное эпигенетическое изменение, что приводит к реактивации гена и увеличению экспрессии miR-506 [30]. Запуск повышенного синтеза и активации miR-506 приводит к ингибированию синтеза InsP₃R3 и AE2 [106]. В результате уменьшается поступление бикарбоната в просвет желчного протока и происходит накопление HCO₃⁻ в цитозоле хolangиоцитов [30]. Изменение



вне- и внутриклеточного pH влияет на состояние протонирования (в просвете желчного протока) и депротонирования (внутри холангиоцита) желчных кислот, увеличиваются неконтролируемое поступление и накопление неконъюгированных и конъюгированных с глицином желчных кислот в БЭК.

Детергентные свойства желчных кислот запускают процесс разрушения клеточных мембран, старение и апоптоз холангиоцитов, пермеабиллизацию митохондрий, деструкцию и иммуномодификацию E2 ПДГ с последующим образованием АМА [105]. Старение, апоптоз и пролиферация холангиоцитов приводят к постепенному развитию дуктулопии. Вовлечение

в патологический процесс ПДГ способствует недостаточному синтезу АТФ, развитию энергетической недостаточности, появлению неспецифического клинического признака – слабости. Развитие дуктулопии сопровождается развитием внутрипеченочного холестаза [107].

Холангиоциты являются основной мишенью на начальной стадии ПБХ. Но как только развивается холестаз, гепатоциты также вовлекаются в патологический процесс, что приводит к их повреждению [30, 108].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Prieto J, Banales J.M., Medina J.F. Primary biliary cholangitis: pathogenic mechanisms. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2021; 37 (2): 91–98.
- Reshetnyak V.I. Primary biliary cirrhosis: clinical and laboratory criteria for its diagnosis. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21 (25): 7683–708.
- De Veer R.C., van Hooff M.C., da Silva G., et al. Quality of life in Dutch patients with primary biliary cholangitis: discrepancies between patients' perspectives and objective disease parameters. *Hepatol. Res.* 2023; 53 (5): 401–408.
- Neuberger J., Thomson R. PBC and AMA – what is the connection? *Hepatology.* 1999; 29 (1): 271–276.
- Chen R., Tang R., Ma X., Gershwin M.E. Immunologic responses and the pathophysiology of primary biliary cholangitis. *Clin. Liver Dis.* 2022; 26 (4): 583–611.
- Mutimer D.J., Fussey S.P., Yeaman S.J., et al. Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1989; 10 (4): 403–407.
- Van Norstrand M.D., Malinchoc M., Lindor K.D. Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression. *Hepatology.* 1997; 25 (1): 6–11.
- Coppel R.L., McNeillage L.J., Surh C.D., et al. Primary structure of the human M2 mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis: dihydrolipoamide acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (19): 7317–7321.
- Krams S.M., Surh C.D., Coppel R.L., et al. Immunization of experimental animals with dihydrolipoamide acetyltransferase, as a purified recombinant polypeptide, generates mitochondrial antibodies but not primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1989; 9 (3): 411–416.
- Fussey S.P., Lindsay J.G., Fuller C., et al. Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: analysis of reactivity against eukaryotic and prokaryotic 2-oxo acid dehydrogenase complexes. *Hepatology.* 1991; 13 (3): 467–474.
- Lindenborn-Fotinos J., Baum H., Berg P.A. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: species and nonspecies specific determinants of M2 antigen. *Hepatology.* 1985; 5 (5): 763–739.
- Frazer I.H., Mackay I.R., Jordan T.W., et al. Reactivity of anti-mitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis: definition of two novel mitochondrial polypeptide autoantigens. *J. Immunol.* 1985; 135 (3): 1739–1745.
- Stemerowicz R., Hopf U., Möller B., et al. Are antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis induced by R(rough)-mutants of enterobacteriaceae? *Lancet.* 1988; 2 (8621): 1166–1170.
- Khor S.-S., Ueno K., Nishida N., et al. Novel HLA allele associations with susceptibility, staging, symptomatic state, autoimmune hepatitis and hepatocellular carcinoma events for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1151502.
- Burroughs A.K., Rosenstein I.J., Epstein O., et al. Bacteriuria and primary biliary cirrhosis. *Gut.* 1984; 25 (2): 133–137.
- Логонов А.С., Царегородцева Т.М., Зотина М.М. Иммунная система и болезни органов пищеварения. М.: Медицина, 1986.
- Hohenester S., Wenniger L.M., Paulusma C.C., et al. A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology.* 2012; 55 (1): 173–183.
- Hofmann A.F. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front. Biosci. (Landmark Ed.).* 2009; 14 (7): 2584–2598.
- Matsubara T., Kozaka K., Matsui O., et al. Peribiliary glands: development, dysfunction, related conditions and imaging findings. *Abdom. Radiol. (NY).* 2020; 45 (2): 416–436.
- Banales J.M., Prieto J., Medina J.F. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12 (22): 3496–3511.
- Carpino G., Cardinale V., Onori P., et al. Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages. *J. Anat.* 2012; 220 (2): 186–199.
- Maillette de Buy Wenniger L.J., Hohenester S., Maroni L. The cholangiocyte glycocalyx stabilizes the 'biliary HCO₃⁻ umbrella': an integrated line of defense against toxic bile acids. *Dig. Dis.* 2015; 33 (3): 397–407.
- Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14 (37): 5641–5649.
- Hrncir H.R., Gracz A.D. Cellular and transcriptional heterogeneity in the intrahepatic biliary epithelium. *Gastro Hep. Adv.* 2023; 2 (1): 108–120.

25. Hirata K., Nathanson M.H. Bile duct epithelia regulate biliary bicarbonate excretion in normal rat liver. *Gastroenterology*. 2001; 121 (2): 396–406.
26. Tabibian J.H., Masyuk A.I., Masyuk T.V., et al. Physiology of cholangiocytes. *Compr. Physiol*. 2013; 3 (1): 541–565.
27. Marzioni M., Glaser S.S., Francis H., et al. Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin. Liver Dis*. 2002; 22 (3): 227–240.
28. Kanno N., LeSage G., Glaser S., Alpini G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2001; 281 (3): G612–625.
29. Masyuk A.I., Masyuk T.V., Tietz P.S., et al. Intrahepatic bile ducts transport water in response to absorbed glucose. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 2002; 283 (3): 785–791.
30. Chang J.C., Go S., Verhoeven A.J., et al. Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in cholangiocyte apoptosis in primary biliary cholangitis; a new hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis*. 2018; 1864 (4 Pt B): 1232–1239.
31. Rodrigues M.A., Gomes D.A., Nathanson M.H. Calcium signaling in cholangiocytes: methods, mechanisms, and effects. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19 (12): 3913.
32. Dranoff J.A., Masyuk A.I., Kruglov E.A., et al. Polarized expression and function of P2Y ATP receptors in rat bile duct epithelial. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2001; 281 (4): G1059–1067.
33. Nathanson M.H., Burgstahler A.D., Mennone A., Boyer J.L. Characterization of cytosolic Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia. *Am. J. Physiol*. 1996; 271 (1 Pt 1): G86–96.
34. Lemos F.O., Florentino R.M., Lima Filho A.C.M., et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the liver: expression and function. *World J. Gastroenterol*. 2019; 25 (44): 6483–6494.
35. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2003; 4 (7): 517–529.
36. Trampert D.C., Nathanson M.H. Regulation of bile secretion by calcium signaling in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res*. 2018; 1865 (11 Pt B): 1761–1770.
37. Li Q., Dutta A., Kresge C., et al. Bile acids stimulate cholangiocyte fluid secretion by activation of transmembrane member 16A Cl⁻ channels. *Hepatology*. 2018; 68 (1): 187–199.
38. Dutta A.K., Khimji A.K., Kresge C., et al. Identification and functional characterization of TMEM16A, a Ca²⁺-activated Cl-channel activated by extracellular nucleotides, in biliary epithelium. *J. Biol. Chem*. 2011; 286 (1): 766–776.
39. Afroze S., Meng F., Jensen K., et al. The physiological roles of secretin and its receptor. *Ann. Transl. Med*. 2013; 1 (3): 29.
40. Boyer J.L. Bile duct epithelium: frontiers in transport physiology. *Am. J. Physiol*. 1996; 270 (1 Pt 1): G1–5.
41. Alpini G., Phinizy J.L., Glaser S., et al. Development and characterization of secretin-stimulated secretion of cultured rat cholangiocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2003; 284 (6): G1066–1073.
42. Banales J.M., Arenas F., Rodríguez-Ortigosa C.M., et al. Bicarbonate-rich choleresis induced by secretin in normal rat is taurocholate-dependent and involves AE2 anion exchanger. *Hepatology*. 2006; 43 (2): 266–275.
43. Alvaro D., Cho W.K., Mennone A., Boyer J.L. Effect of secretion on intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J. Clin. Invest*. 1993; 92 (3): 1314–1325.
44. Minagawa N., Nagata J., Shibao K., et al. Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile. *Gastroenterology*. 2007; 133 (5): 1592–1602.
45. Tietz P.S., Alpini G., Pham L.D., Larusso N.F. Somatostatin inhibits secretin-induced ductal hypercholeresis and exocytosis by cholangiocytes. *Am. J. Physiol*. 1995; 269 (1 Pt 1): G110–118.
46. Amelsberg A., Schteingart C.D., Ton-Nu H.T., Hofmann A.F. Carrier-mediated jejunal absorption of conjugated bile acids in the guinea pig. *Gastroenterology*. 1996; 110 (4): 1098–1106.
47. Masyuk A.I., Masyuk T.V., LaRusso N.F. *Physiology of Cholangiocytes*. New York: Academic Press, 2006.
48. Fini A., Ferocia G., Roda A. Acidity in bile acid systems. *Polyhedron*. 2002; 21: 1421–1427.
49. Bortolini O., Bernardi T., Fantin G., et al. Relative acidity scale of glycine- and taurine-conjugated bile acids through ESI-MS measurements. *Steroids*. 2011; 76 (6): 596–602.
50. Pavlović N., Goločorbin-Kon S., Đanić M., et al. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmacokinetic profiles. *Front. Pharmacol*. 2018; 9: 1283.
51. Dawson P.A., Shneider B., Hofmann A. Bile formation and the enterohepatic circulation. In: L.R. Johnson, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2006.
52. Alpini G., Glaser S.S., Rodgers R., et al. Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology*. 1997; 113 (5): 1734–1740.
53. Benedetti A., Di Sario A., Marucci L., et al. Carrier-mediated transport of conjugated bile acids across the basolateral membrane of biliary epithelial cells. *Am. J. Physiol*. 1997; 272 (6 Pt 1): G1416–24.
54. Hirohashi T., Suzuki H., Takikawa H., Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J. Biol. Chem*. 2000; 275 (4): 2905–2910.
55. Lazaridis K.N., Pham L., Tietz P., et al. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest*. 1997; 100 (11): 2714–2721.
56. Lazaridis K.N., Tietz P., Wu T., et al. Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97 (20): 11092–11097.
57. Carey M.C. Physical-chemical properties of bile acids and their salts. In: H. Danielsson, J. Sjovall, eds. *Sterols and Bile Acids*. Amsterdam: Elsevier, 1985.

58. Hofmann A.F. Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. *Hepatology*. 2009; 49 (5): 1403–1418.
59. Luo Z.L., Cheng L., Wang T., et al. Bile acid transporters are expressed and heterogeneously distributed in rat bile ducts. *Gut Liver*. 2019; 13 (5): 569–575.
60. Prieto J., Qian C., Garcia D. Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1993; 105 (2): 572–578.
61. Medina J.F., Martínez-Ansó, Vazquez J.J., Prieto J. Decreased anion exchanger 2 immunoreactivity in the liver of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1997; 25 (1): 12–17.
62. Ananthanarayanan M., Banales J.M., Guerra M.T., et al. Post-translational regulation of the type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by miRNA-506. *J. Biol. Chem.* 2015; 290 (1): 184–196.
63. Banales J.M., Sáez E., Uriz M., et al. Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2012; 56 (2): 687–697.
64. Shibao K., Hirata K., Robert M.E., Nathanson M.H. Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis. *Gastroenterology*. 2003; 125 (4): 1175–1187.
65. Melero S., Spirlri C., Zsembery A., et al. Defective regulation of cholangiocyte Cl⁻/HCO₃⁻ and Na⁺/H⁺ exchanger activities in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2002; 35 (6): 1513–1521.
66. Erice O., Munoz-Garrido P., Vaquero J., et al. MicroRNA-506 promotes primary biliary cholangitis-like features in cholangiocytes and immune activation. *Hepatology*. 2018; 67 (4): 1420–1440.
67. Concepcion A.R., Lopez M., Ardura-Fabregat A., Medina J.F. Role of AE2 for pHi regulation in biliary epithelial cells. *Front. Physiol.* 2014; 4: 413.
68. Komichi D., Tazuma S., Nishioka T., et al. Unique inhibition of bile salt-induced apoptosis by lecithins and cytoprotective bile salts in immortalized mouse cholangiocytes. *Dig. Dis. Sci.* 2003; 48 (12): 2315–2322.
69. Borkham-Kamphorst E., Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 28: 53–61.
70. Strazzabosco M. Transport systems in cholangiocytes: their role in bile formation and cholestasis. *Yale J. Biol. Med.* 1997; 70 (4): 427–434.
71. Chang J.C., Go S., de Waart D.R., et al. Soluble adenylyl cyclase regulates bile salt-induced apoptosis in human cholangiocytes. *Hepatology*. 2016; 64 (2): 522–534.
72. Trautwein C., Friedman S.L., Schuppan D., Pinzani M. Hepatic fibrosis: concept to treatment. *J. Hepatol.* 2015; 62 (1 Suppl): S15–24.
73. Saipiyeva D., Askarov M., Tuganbekov T., et al. Antimitochondrial and antinuclear antibodies in primary biliary cholangitis. *J. Clin. Med. Kazakh.* 2019; 2 (52): 16–23.
74. Szalai G., Krishnamurthy R., Hajnóczky G. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 1999; 18 (22): 6349–6361.
75. Csordás G., Thomas A.P., Hajnóczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.* 1999; 18 (1): 96–108.
76. Ichas F., Jouaville L.S., Mazat J.P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 1997; 89 (7): 1145–1153.
77. Berg C.P., Stein G.M., Keppeler H., et al. Apoptosis-associated antigens recognized by autoantibodies in patients with the autoimmune liver disease primary biliary cirrhosis. *Apoptosis*. 2008; 13 (1): 63–75.
78. Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 78: 129–141.
79. Surh C.D., Roche T.E., Danner D.J., et al. Antimitochondrial autoantibodies in primary biliary cirrhosis recognize cross-reactive epitope(s) on protein X and dihydrolipoamide acetyltransferase of pyruvate dehydrogenase complex. *Hepatology*. 1989; 10 (2): 127–133.
80. Gulamhusein A.F., Hirschfield G.M. Pathophysiology of primary biliary cholangitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2018; 34–35: 17–25.
81. Ge S., Xu Q., Li H., et al. Differential immune response to xenobiotic-modified self-molecule in simple and connective tissue disease-associated primary biliary cholangitis. *Liver Int.* 2022; 42 (10): 2204–2215.
82. Rieger R., Gershwin M.E. The X and why of xenobiotics in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* 2007; 28 (2–3): 76–84.
83. Wang J., Budamagunta M.S., Voss J.C., et al. Antimitochondrial antibody recognition and structural integrity of the inner lipoyl domain of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase complex. *J. Immunol.* 2013; 191 (5): 2126–2133.
84. Naiyanetr P., Butler J.D., Meng L., et al. Electrophile-modified lipoyl derivatives of PDC-E2 elicits anti-mitochondrial antibody reactivity. *J. Autoimmun.* 2011; 37 (3): 209–216.
85. Rahmatullah M., Gopalakrishnan S., Andrews P.C., et al. Subunit associations in the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. Structure and role of protein X and the pyruvate dehydrogenase component binding domain of the dihydrolipoyl transacetylase component. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (4): 2221–2227.
86. Fussey S.P., Bassendine M.F., James O.F., Yeaman S.J. Characterisation of the reactivity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *FEBS Lett.* 1989; 246 (1–2): 49–53.
87. Surh C.D., Coppel R., Gershwin M.E. Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope. *J. Immunol.* 1990; 144 (9): 3367–3374.
88. Ohmori H., Yamauchi T., Yamamoto I. Augmentation of the antibody response by lipoyl acid in mice. I. Analysis of the mode of action in an in vitro cultures system. *Jpn. J. Pharmacol.* 1986; 42 (1): 135–140.

89. Colapietro F, Lleo A., Generali E. Antimitochondrial antibodies: from bench to bedside. Clin. Rev. All. Immunol. 2022; 63 (2): 166–177.
90. Sogolow E.D., Lasker J.N., Short L.M. Fatigue as a major predictor of quality of life in women with autoimmune liver disease: the case of primary biliary cirrhosis. Womens Health Issues. 2008; 18: 336–342.
91. Kremer A.E., Mayo M.J., Hirschfield G., et al. Seladelpar improved measures of pruritus, sleep, and fatigue and decreased serum bile acids in patients with primary biliary cholangitis. Liver Int. 2022; 42 (1): 112–123.
92. Shamshtein D., Liwinski T. Pathogenesis and management of fatigue in primary biliary cholangitis. Fatig. Biomed. Health Behav. 2022; 10 (1): 1–25.
93. Abbas G., Jorgensen R.A., Lindor K.D. Fatigue in primary biliary cirrhosis. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2010; 7: 313–319.
94. Witt-Sullivan H., Heathcote J., Cauch K., et al. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. Hepatology. 1990; 12 (1): 98–105.
95. Galoosian A., Hanlon C., Zhang J., et al. Clinical updates in primary biliary cholangitis: trends, epidemiology, diagnostics, and new therapeutic approaches. J. Clin. Transl. Hepatol. 2020; 8 (1): 49–60.
96. Newton J.L., Gibson G.J., Tomlinson M., et al. Fatigue in primary biliary cirrhosis is associated with excessive daytime somnolence. Hepatology. 2006; 44: 91–98.
97. Biagini M.R., Tozzi A., Milani S., et al. Fatigue in primary biliary cirrhosis: a possible role of comorbidities. Eur. J. Gastroenterol. Hepatology. 2008; 20: 1220–1226.
98. Newton J.L. Fatigue in primary biliary cirrhosis. Clin. Liver Dis. 2008; 12 (2): 67–83.
99. Reshetnyak V.I., Maev I.V. Mechanism for development of malnutrition in primary biliary cholangitis. World J. Meta-Anal. 2022; 10 (3): 81–98.
100. Flannery G.R., Burroughs A.K., Butler P., et al. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis recognize both specific peptides and shared epitopes of the M2 family of antigens. Hepatology. 1989; 10 (3): 370–374.
101. Green J.H., Bramley P.N., Losowsky M.S. Are patients with primary biliary cirrhosis hypermetabolic? A comparison between patients before and after liver transplantation and controls. Hepatology. 1991; 14: 464–472.
102. Jopson L., Jones D.E. Fatigue in primary biliary cirrhosis: prevalence, pathogenesis and management. Dig. Dis. 2015; 33 (2): 109–114.
103. Parikh-Patel A., Gold E.B., Utts J., et al. Functional status of patients with primary biliary cirrhosis. Am. J. Gastroenterol. 2002; 97: 2871–2879.
104. Griffiths L., Jones D.E. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis and its fatigue. Dig. Dis. 2014; 32: 615–625.
105. Reshetnyak V.I., Maev I.V. New insights into the pathogenesis of primary biliary cholangitis asymptomatic stage. World J. Gastroenterol. 2023; 29 (37): 5292–5304.
106. Mardones P., Medina J.F., Elferink R.P. Activation of cyclic AMP signaling in Ae2-deficient mouse fibroblasts. J. Biol. Chem. 2008; 283 (18): 12146–12153.
107. Reshetnyak V.I. Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis. World J. Gastroenterol. 2006; 12 (45): 7250–7262.
108. Reshetnyak V.I., Maev I.V. Pathophysiology of biochemical signs of primary biliary cholangitis. Explor. Dig. Dis. 2023; 2: 149–171.

Mechanism of Small Cholangiocyte Injury in Primary Biliary Cholangitis

V.I. Reshetnyak, PhD, Prof., I.V. Maev, PhD, Prof., Academician of the RAS

Russian University of Medicine, Moscow

Contact person: Vasilii I. Reshetnyak, vasilii.reshetnyak@yandex.ru

Primary biliary cholangitis (PBC) is a chronic cholestatic progressive liver disease and one of the most important progressive cholangiopathies in adults. Damage to cholangiocytes triggers the development of intrahepatic cholestasis, which progresses to cirrhosis in the terminal stage of the disease. Accumulating data indicate that damage to biliary epithelial cells [(BECs), cholangiocytes] is most likely associated with the intracellular accumulation of bile acids, which have potent detergent properties and damaging effects on cell membranes. The mechanisms underlying uncontrolled bile acid intake into BECs in PBC are associated with pH change in the bile duct lumen, which is controlled by the bicarbonate (HCO_3^-) buffer system "biliary HCO_3^- umbrella". The impaired production and entry of HCO_3^- from BECs into the bile duct lumen is due to epigenetic changes in expression of the X-linked microRNA 506. Based on the growing body of knowledge on the molecular mechanisms of cholangiocyte damage in patients with PBC, we propose a hypothesis explaining the pathogenesis of the first morphologic (ductulopenia), immunologic (antimitochondrial autoantibodies) and clinical (weakness, malaise, rapid fatigue) signs of the disease in the asymptomatic stage. This review focuses on the consideration of these mechanisms.

Keywords: primary biliary cholangitis, antimitochondrial autoantibodies, microRNA 506, inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 3, chloride/bicarbonate anion exchanger 2, biliary bicarbonate umbrella, dihydrolipoyl transacetylase (E2 subunit) pyruvate dehydrogenase complex