

УДК 616.72-002.77

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КОМПЛЕКСА КСАНТИНОКСИДАЗА/КСАНТИНДЕГИДРОГЕНАЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЛИЗАТАХ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С СЕРОПОЗИТИВНОЙ И СЕРОНЕГАТИВНОЙ ФОРМАМИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

¹Бедина С.А., ¹Мозговая Е.Э., ^{1,2}Трофименко А.С., ^{1,2}Зборовская И.А.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;

²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград

Описан профиль активности ксантиноксидазы (КО) и ксантиндегидрогеназы (КДГ) в плазме крови и циркулирующих лимфоцитах у 75 (52 женщины и 23 мужчины) больных ревматоидным артритом (РА). Диагноз устанавливался на основе критериев, рекомендованных ACR/EULAR 2010. Степень активности ревматоидного процесса определялась с использованием индекса DAS 28. Серопозитивная форма РА наблюдалась у 49 (65,3%) больных. В качестве контроля использовали образцы 35 здоровых лиц. Для энзимного профиля больных РА характерно повышение активности КО в плазме крови и снижение активности КО и КДГ в лимфоцитах. Проведенные нами исследования выявили зависимость изученных энзимных показателей от наличия или отсутствия ревматоидного фактора. Показано, что у больных с серопозитивной формой РА активность КО в плазме крови повышена в большей степени, чем при серонегативном варианте, а активность КДГ, сниженная при серонегативной форме РА, повышается у больных с серопозитивным РА. В лизатах лимфоцитов активность КО и КДГ снижена при обеих формах РА. Наиболее выраженные изменения активности энзимов обнаружены у больных РА с серопозитивной формой.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ксантиноксидаза, ксантиндегидрогеназа, лизаты лимфоцитов, плазма крови

ACTIVITY OF THE XANTINOXIDASE/XANTINDHYDROGENASE ENZYMATIC SYSTEM IN BLOOD PLASMA AND LYMPHOCYTES IN SEROPOSITIVE AND SERONEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

¹Bedina S.A., ¹Mozgovaya E.E., ^{1,2}Trofimenko A.S., ^{1,2}Zborovskaya I.A.

¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy», Volgograd, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;

²The Volgograd State Medical University, Volgograd

Characterized enzymatic patterns of the xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDG) in blood plasma and lymphocytes of 75 (52 women and 23 men) rheumatoid arthritis (RA) patients. Diagnosis of RA had been established using ACR/EULAR 2010 criteria. Activity was assessed by means of DAS 28 index. The seropositive form of RA was observed in 49 (65.3%) patients. 35 healthy controls were included in the study. The enzymatic patterns of RA patients is characterized by an increase in the activity of XO in the blood plasma and a decrease in the activity of XO and XDG in lymphocytes. Enzyme profile of patients with RA is characterized by increased activity of XO in the blood plasma and low activity of XO and XDG in lymphocytes. Our study revealed the relationship between enzyme parameters and rheumatoid factor. In patients with seropositive RA the activity of XO in the blood plasma is higher than in patients with a seronegative RA. In patients with seronegative RA the activity of XDG in the blood plasma is decreased, and in patients with seropositive RA the activity of XDG in the blood plasma is increased. The activity of XO and XDG in lymphocytes was reduced in both forms of RA. In patients with seropositive RA more pronounced changes in the enzyme activity were observed.

Keywords: rheumatoid arthritis, xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, lymphocytes, blood

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим аутоиммунным заболеванием, характеризующимся наличием ревматоидного фактора (РФ) и антител к циклическому цитруллинированному пептиду.

Из всех иммуновоспалительных ревматических заболеваний РА относится к категории наиболее распространенных и социально значимых болезней. Им болеет от 0,5% до 2% взрослого населения нашей планеты, причем около 70% – это женщины. РА поражает людей молодого, трудоспособного возраста и характеризуется тя-

желым течением, ранней инвалидностью, снижением качества жизни, неблагоприятным прогнозом. Это одно из самых дорогостоящих заболеваний, что ведет к значительной социально-экономической нагрузке как на самого больного, так и на общество в целом. Кроме того, РА сопровождается коморбидными состояниями: кардиоваскулярными (инфаркт миокарда, инсульт, тромбоз сосудов), онкологическими, инфекционными, с развитием которых связан высокий риск преждевременного летального исхода. Основными составляющими элементами

борьбы с РА являются: ранняя и своевременная диагностика, выяснение этиопатогенетических механизмов развития заболевания, профилактика и адекватное лечение. На современном этапе ко многим аспектам еще остаются вопросы. Поэтому исследования РА не потеряли своей актуальности и в настоящее время.

На сегодняшний день нет единого взгляда на этиопатогенез РА. Существует множество теорий развития заболевания. Но большинство исследователей склоняются к тому, что РА – многофакторное заболевание и в его возникновении и прогрессировании участвуют как минимум 3 фактора: инфекционный, иммуногенетический и аутоиммунный.

Наметившийся в XXI веке прогресс в плане раскрытия механизмов патогенеза связан с выяснением некоторых звеньев аутоиммунного ответа. В результате этого появилась возможность поиска новых лекарственных препаратов, направленных на блокирование отдельных патогенетических звеньев. Однако единая, научно обоснованная, концепция патогенеза РА так и не разработана. Поэтому окончательную точку в этом вопросе ставить еще рано.

В последние годы мировым научным сообществом активно обсуждается роль НЕТоза (процесса образования нейтрофилами внеклеточных ловушек) в возникновении и прогрессировании различных патологических состояний организма, в том числе и аутоиммунных [1].

Высказываются гипотезы, что компоненты экстрацеллюлярных ловушек могут выступать этиологическим фактором, инициируя аутоиммунное воспаление при РА, а также способствуют его хронизации, выступая в качестве факторов аутоагрессии [2, 3].

Фактически ловушки представляют собой сетеподобные структуры, сотканые из нитей ядерной ДНК, гистонов, цитоплазматических белков и компонентов гранул нейтрофилов [4]. Следовательно, функция ДНК заключается не только в хранении и передаче генетического материала, но и в защите организма от различных экзогенных и эндогенных патогенов. Обычно этот процесс сопровождается смертью нейтрофилов.

Сравнительно недавно был описан механизм образования ловушек нейтрофилами, который не приводит их к гибели. В состав таких экстрацеллюлярных ловушек входила митохондриальная ДНК [5].

Чаще всего НЕТоз происходит при участии активных форм кислорода (АФК) – это так называемый АФК-зависимый НЕТоз. Интенсивность образования нейтрофильных внеклеточных ловушек зависит от гене-

рации АФК и активности НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы [6].

АФК также образуются и в ходе деградации пуриновых метаболитов. Одной из таких реакций является окисление гипоксантина и ксантина в присутствии ксантиноксидазы. Ксантиноксидаза – ведущий прооксидантный фермент. Литературных данных о повреждающем воздействии АФК на ДНК много [1–4, 6]. А роль прооксидантных ферментных систем в механизмах НЕТоза выяснена недостаточно.

Цель исследования: изучить профиль ксантиноксидазы (КО) и ксантиндегидрогеназы (КДГ) в плазме крови и циркулирующих лимфоцитах у больных РА серонегативных и серопозитивных по ревматоидному фактору.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 75 (52 женщины и 23 мужчины) больных РА и 35 практически здоровых людей. Отбор больных проводился в ревматологическом отделении ГКБ СМП № 25 г. Волгограда. Диагноз устанавливался на основе критериев, рекомендованных ACR/EULAR 2010 [7]. Средний возраст больных составил $43,9 \pm 0,97$ лет, средняя продолжительность заболевания – $8,5 \pm 0,3$ лет. Степень активности ревматоидного процесса определялась с использованием индекса DAS 28. I (минимальная) степень установлена у 15 (20%), II (умеренная) – у 49 (65,3%) и III (максимальная) – у 11 (14,7%) больных. Первая рентгенологическая стадия поражения суставов по Штейн-Брокеру определялась у 8 (9,7%), II – у 53 (57,6%), III – у 25 (27,2%), IV – 6 (6,5%) больных. У всех больных наблюдалось ограничение функциональных возможностей суставов: I функциональный класс (ФК-1) установлен у 30 (40%) больных, ФК-2 – у 40 (53,3%) и ФК-3 – у 5 (6,7%) больных. Серопозитивная форма РА наблюдалась у 49 (65,3%) больных, серонегативная – у 26 (34,7%). Суставная форма обнаружена у 44 (58%) больных РА. У 31 (41,3%) больного выявлены системные поражения. Из внесуставных поражений наиболее часто диагностировалась патология мышц (31,3%), сердца (27,5%), желудочно-кишечного тракта (26,3%), почек (13,8%).

Комплексное медикаментозное лечение больных РА включало нестероидные противовоспалительные средства: индометацин, диклофенак, мовалис, кетопрофен, мелоксикам, напроксен, целекоксиб и др.; базисную терапию: метотрексат, сульфасалазин, инфликсимаб, лефлуномид, гидроксихлорохин; глюкокортикоиды. Лечение проводилось с учетом клинических особенностей заболевания, степени активности процесса, характера течения, внесуставных поражений.

Объектами исследований служили плазма и лизаты лимфоцитов периферической крови здоровых лиц и больных РА. Лимфоциты из венозной крови выделяли по методике *Boyum* методом дифференциального центрифугирования с использованием лимфосепа (Lymph separation medium) фирмы «JCN Biomedicals» в градиенте плотности $1,077\text{--}1,079$ г/мл [8]. Лизаты клеток готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания с последующим центрифугированием. Активность ксантиноксидазы (КО; E.C. 1.17.3.2)

и ксантиндегидрогеназы (КДГ; Е.С. 1.17.1.4) в плазме и лизатах лимфоцитов определяли спектрофотометрическим методом по ранее опубликованным методикам и выражали в нмоль/мин/мл [9]. Для лизатов лимфоцитов активность приводили к содержанию клеток 1×10^7 на 1 мл.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.0. Результаты выражали как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Подбор критериев для сравнения групп осуществляли по общепринятым правилам. Достоверными различия считались при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Обследовано 35 практически здоровых людей в возрасте от 18 до 55 лет, среди которых было 24 (68,6%) женщин и 11 (31,4%) мужчин; средний возраст – $37,2 \pm 2,18$ лет. Существенной зависимости активности энзимов от пола и возраста выявлено не было, что позволило в дальнейших исследованиях эти факторы не учитывать. Референтные пределы активности ферментов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Референтные пределы активности ферментов в плазме крови и лизатах лимфоцитов

Фермент	Референтные пределы ($M \pm 2\sigma$), нмоль/мин/мл	
	Плазма	Лимфоциты
КО	2,60–3,96	14,2–27,8
КДГ	4,49–5,93	22,5–40,7

У больных РА (группа в целом) по сравнению с референтной группой (табл. 2) в плазме выявлено повышение активности КО, незначительное снижение активности КДГ; в лизатах лимфоцитов – снижение активности КО, КДГ. В своих более ранних работах нами была обнаружена зависимость активности КО и КДГ от активности патологического процесса [10, 11]. Поскольку РФ выполняет роль индикатора воспалительного процесса и аутоиммунных нарушений, мы предположили, что наличие РФ может также оказывать влияние на энзимный профиль крови.

У больных РА с серопозитивной формой по сравнению с контрольной группой (табл. 2) в плазме выше активность КО и КДГ, в лимфоцитах активность КО и КДГ ниже. У больных РА с серонегативной формой (табл. 2) в плазме крови выше активность КО, но ниже активность КДГ, а в лимфоцитах активность обоих ферментов снижена.

Сравнение этих двух форм РА показало, что у больных с серопозитивной по сравнению с серонегативной формой (табл. 2)

в плазме выше активность КО, КДГ, в лимфоцитах ниже активность КО и КДГ.

Таким образом, проведенные нами исследования выявили зависимость изученных энзимных показателей от наличия или отсутствия РФ. Показано, что у больных с серопозитивной формой РА активность КО в плазме крови повышена в большей степени, чем при серонегативном варианте, а активность КДГ, сниженная при серонегативной форме РА, повышается у больных с серопозитивным РА. В лизатах лимфоцитов активность КО и КДГ снижена и при серопозитивной, и при серонегативной формах РА, но наиболее выраженные изменения активности энзимов обнаружены у больных РА с серопозитивной формой. КО и КДГ – две взаимопревращающиеся формы ксантиноксидоредуктазы. Уникальный ферментный комплекс ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа является одной из главных систем генерирования активных форм кислорода в организме. Трансформация фермента в кислород-зависимую форму – КО запускается разными механизмами [12]. Активация КО-реакции приводит к генерации супероксидных радикалов, которые оказывают токсическое воздействие на хроматин и белки ядра клетки и запускают генетически запрограммированную гибель клеток – апоптоз [13]. Кроме того, в условиях дефицита NAD^+ , возникающего при воспалении, КДГ также может генерировать супероксид, еще до трансформации КДГ в КО [14]. По мнению исследователей, важную роль в модуляции клеточного баланса между КДГ и КО играет НАДФН-оксидаза. АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, стимулируют превращение ксантиноксидоредуктазы из ее дегидрогеназной формы (КДГ) в оксидазную (КО) [15].

По данным современных научных исследований, наряду с интерлейкинами и липополисахаридами, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек провоцирует и РФ [2].

Таким образом, исходя из полученных нами данных, мы можем предположить, что в развитии и прогрессировании аутоиммунного процесса при РА активное участие принимают прооксидантные энзимные системы, что не противоречит и литературным данным.

В настоящее время все еще остается непонятным механизм переключения между различными эффекторными программами лейкоцитов. Высказывается предположение, что NETоз является резервным механизмом в программе активной контролируемой клеточной гибели нейтрофилов и запускается после неудачного фагоцитоза, апоптоза [4].

Таблица 2

Активность ферментов в плазме крови и лимфоцитах у больных РА

Энзим	Здоровые, n = 35	Больные РА		
		Группа в целом, n = 75	Серопозитивная форма, n = 49	Серонегативная форма, n = 26
КО в плазме	3,28 ± 0,06 ²	5,74 ± 0,10 ²	6,17 ± 0,11 ^{2,*}	5,46 ± 0,12 ^{2,*}
КДГ в плазме	5,21 ± 0,06 ^{1,2}	4,99 ± 0,08 ³	5,47 ± 0,09 ^{1,*}	4,65 ± 0,08 ^{2,*}
КО в лимфоцитах	21 ± 0,59 ²	11,2 ± 0,30 ²	10,0 ± 0,31 ^{2,*}	12,0 ± 0,41 ^{2,*}
КДГ в лимфоцитах	31,6 ± 0,80 ²	15,6 ± 0,36 ²	14,0 ± 0,46 ^{2,*}	16,7 ± 0,45 ^{2,*}

Примечание. ¹p < 0,05. ²p < 0,001. ³p > 0,05. Непарный критерий Стьюдента.
*p < 0,001. Парный критерий Стьюдента.

Лечение РА препаратами нового поколения позволяет контролировать течение заболевания и значительно улучшить качество жизни больных. Но, несмотря на успехи в этом направлении, достигнуть необходимого терапевтического результата удается не всегда. Вероятно, это связано с тем, что не все патогенетические механизмы, поддерживающие воспалительный процесс, выяснены на данный момент. Дальнейшее изучение патогенетических путей и создание новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов, направленных на блокирование патологических реакций, остается актуальной задачей современной медицины.

Выводы

1. Для энзимного профиля больных РА характерно повышение активности КО в плазме крови и снижение активности КО и КДГ в лимфоцитах.

2. Наиболее выраженные изменения активности энзимов обнаружены у больных РА с серопозитивной формой.

Список литературы

1. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии / Н.В. Воробьева, Б.В. Пинегин // Биохимия. – 2014. – Т. 79, Вып. 12. – С. 1580–1591.
2. Wright H.L. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis / H.L. Wright, R.J. Moots, S.W. Edwards // Nature Reviews Rheumatology. – 2014. – Vol. 10(10). – P. 593–601. URL: <http://www.nature.com/nrrheum/journal/vaop/ncurrent/full/nrrheum.2014.80.html> (date of access: 17.05.2018).
3. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis / R. Khandpur, C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri et al. // Sci Transl Med. – 2013. – Vol. 5(178). – P. 178ra40.
4. Участие внеклеточных ДНК-ловушек в защитных и патологических реакциях организма / И.И. Долгушин, А.Ю. Савочкина, И.В. Курносенко и др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2. – С. 164–170.

5. Yousefi S. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps / S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozlowski et al. // Cell Death Differ. – 2009. – Vol. 16. – P. 1438–1444.

6. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans / W. Stoiber, A. Obermayer, P. Steinbacher, W.-D. Krautgartner // Biomolecules. – 2015. – Vol. 5. – P. 702–723.

7. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman et al. // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62. – P. 2569–2581.

8. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.В. Алексеев [и др.]; под ред. А.И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – Т. 1. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 472 с.

9. Мартемьянов В.Ф. Клиническое значение исследования активности ферментов и изоферментов пуринового метаболизма в плазме крови больных анкилозирующим спондилитом / В.Ф. Мартемьянов, Е.Э. Мозговая, С.А. Бедина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12–6. – С. 1048–1052.

10. Особенности пуринового метаболизма при ревматоидном артрите, остеоартрозе и подагрическом артрите / В.Ф. Мартемьянов, Е.Э. Мозговая, М.Ю. Стажаров, С.А. Бедина // Вестник Смоленской медицинской академии. – 2004. – № 5. – С. 65–69.

11. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите / Е.Э. Мозговая, В.Ф. Мартемьянов, М.Ю. Стажаров, С.А. Бедина // Врач-аспирант. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 45–50.

12. Mechanism of the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase. Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant / T. Nishino, K. Okamoto, Y. Kawaguchi et al. // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 24888–24894.

13. Кожемякин Л.А. Ксантиноксидазная активность тимоцитов при лимфоцитолитическом действии гипоксантина / Л.А. Кожемякин, Е.П. Шелепина, В.Г. Антонов // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, Вып. 1. – С. 87–89.

14. Harris C.M. The Reaction of Reduced Xanthine Dehydrogenase with Molecular Oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical / C.M. Harris, V. Massey // J. Biol. Chem. 1997. – Vol. 272. – P. 8370–8379.

15. Надеев А.Д. Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы / А.Д. Надеев, Н.В. Гончаров // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2014. – № 4. – С. 80–94.