

УДК 616-002.77

АКТИВНОСТЬ КСАНТИНОКСИДАЗЫ, КСАНТИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

¹Бедина С.А., ¹Мозговая Е.Э., ^{1,2}Трофименко А.С., ³Девятаева Н.М.,

¹Мамус М.А., ^{1,2}Спицына С.С., ¹Тихомирова Е.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;

³ГАПОУ «Волгоградский медицинский колледж», Волгоград

Описан профиль активности супероксиддисмутазы (СОД), ксантиноксидазы (КО) и ксантиндегидрогеназы (КДГ) в плазме крови у 51 (47 женщин и 4 мужчины) больного системной склеродермией (ССД). Диагноз устанавливался на основе критериев, рекомендованных ACR/EULAR 2013. В качестве контроля использовали образцы 30 практически здоровых лиц. Активность ферментов в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом. Референтные пределы активности ферментов ($M \pm 2\sigma$) составили: КО – 2,31–4,55 нмоль/мин/мл; КДГ – 3,77–6,61 нмоль/мин/мл; СОД – 3,34–7,46 ЕД. Проведенные нами исследования выявили зависимость изученных энзимных показателей от клинических особенностей заболевания. Для ССД характерен рост напряженности окислительных и антиоксидантных процессов. Увеличение степени активности склеродермического процесса сопровождается снижением активности СОД на фоне роста активности КО и КДГ. В группе больных с подострым и острым течением ССД в отличие от пациентов с хроническим вариантом течения заболевания отмечены более высокие показатели активности КО, КДГ и СОД. Результаты исследования показывают, что активация ксантиноксидоредуктазы и супероксиддисмутазы играет важную роль в развитии и прогрессировании ССД.

Ключевые слова: системная склеродермия, ксантиноксидоредуктаза, ксантиноксидаза, ксантиндегидрогеназа, супероксиддисмутазы, плазма крови

XANTHINE OXIDASE, XANTHINE DEHYDROGENASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITIES OF BLOOD PLASMA DEPENDING ON CLINICAL FEATURES OF SYSTEMIC SCLEROSIS

¹Bedina S.A., ¹Mozgovaya E.E., ^{1,2}Trofimenko A.S., ³Devyataeva N.M.,

¹Mamus M.A., ^{1,2}Spitsyna S.S., ¹Tikhomirova E.A.

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

²Volgograd State Medical University, Volgograd;

³Volgograd Medical College, Volgograd

Characterized enzymatic patterns of the superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH) in blood plasma of 51 (47 women and 4 men) systemic sclerosis (SSc) patients. Diagnosis of SSc had been established using ACR/EULAR 2013 criteria. 30 healthy controls were included in the study. Enzymatic activity in plasma was determined by spectrophotometric method. Reference intervals ($M \pm 2\sigma$) for XO activity was 2,31-4,55 nmol/min/ml, the XDH activity was 3,77-6,61 nmol/min/ml and the SOD activity was 3,34-7,46 units. Our study revealed the relationship between enzyme parameters and clinical features of the disease. SSc is characterized by an increase in the intensity of oxidative and antioxidant processes. The increase of the pathological process was accompanied with the decrease of SOD activities and the increase of XO, XDH activities. We revealed higher activities levels of xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase and superoxide dismutase in acute and moderate progression of the disease in comparison with chronic type of SSc. The results demonstrate that activation of the xanthine oxidoreductase and superoxide dismutase to play an important role in development and progression of SSc.

Keywords: systemic sclerosis, xanthine oxidoreductase, xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, superoxide dismutase, blood plasma

Системная склеродермия (ССД) является гетерогенным аутоиммунным заболеванием соединительной ткани, характеризующимся гуморальной и клеточной иммунной дисрегуляцией, приводящей к васкулопатии и прогрессирующему фиброзу кожи и внутренних органов. Несмотря на то, что ССД является относительно редким

заболеванием (заболеваемость составляет 3–20 случаев на 1 млн населения в год, распространенность 30–300 случаев на 1 млн), она имеет большое медико-социальное значение. Неуклонно прогрессирующее течение ССД ведет к развитию необратимых распространенных фиброзных изменений и нарушению функций органов, что приво-

дит к длительному, пожизненному лечению заболевания, ранней инвалидизации больных, снижению качества жизни и определяет общий плохой прогноз болезни. Показатели летальности при ССД от поражения внутренних органов (легких, сердца, почек) остаются очень высокими [1, 2].

Варианты течения заболевания отражают темпы прогрессирования ССД. Острое, быстро прогрессирующее течение характеризуется развитием генерализованного фиброза кожи и внутренних органов в первые 1–2 года от начала заболевания, что приводит к органной недостаточности. При подостром, умеренно прогрессирующем течении клинически и лабораторно преобладают признаки иммунного воспаления, нередко перекрестные формы. Хроническое, медленно прогрессирующее течение отличается преобладанием сосудистой патологии, периферических ишемических расстройств, умеренных кожных проявлений и висцеральной патологии.

В настоящее время доказано, что в патогенезе ССД принимают участие несколько взаимосвязанных механизмов: иммуновоспалительные процессы, васкулопатии и фиброз [3, 4]. В то же время патогенез аутоиммунных заболеваний, к которым относится ССД, включает различные изменения метаболических процессов на клеточном и субклеточном уровне, медиаторами которых являются ферменты. Относительно недавно рядом исследований доказана роль «окислительного стресса» в патогенезе ССД [5, 6]. Было обнаружено, что уровни циркулирующих биомаркеров (малоновый диальдегид, липопротеины низкой плотности, изопростаны, тиолы) активных форм кислорода (АФК), коррелируют с васкулопатией, фиброзом и продукцией аутоантител при ССД [7].

АФК регулируют физиологические процессы, поддерживающие окислительно-восстановительный гомеостаз [8]. В ответ на увеличение эндогенной продукции АФК организм может адаптироваться за счет увеличения его антиоксидантной способности. Дисбаланс между выработкой АФК и их инактивацией антиоксидантами приводит к перепроизводству АФК и «окислительному стрессу» [9]. Избыточное образование АФК вызывает повреждение эндотелиальных клеток и сосудистые осложнения. Эти данные свидетельствуют о потенциальной роли АФК и «окислительного стресса» в инициации и прогрессировании васкулопатии при ССД.

«Окислительный стресс», сопровождающийся гиперпродукцией АФК, стимулирует NETоз – образование нейтрофилами экстра-

целлюлярных ловушек. В последнее время активно обсуждается роль этого процесса в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Доказано участие NETоза в инициации и поддержании аутоиммунного воспаления при ревматоидном артрите (РА), системной красной волчанке (СКВ) [10]. Появились первые исследования, продемонстрировавшие активацию NETоза и у пациентов с ССД [11].

Основными источниками внутриклеточной продукции АФК служат ферменты: никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза (NADPH-оксидаза), ксантиноксидоредуктаза (КОР), образующие прооксидантную систему. Антиоксидантную систему составляют ферменты: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза.

Одним из прооксидантных ферментов является ксантиноксидоредуктаза. Она существует в двух взаимопревращающихся формах: ксантиноксидаза – NAD⁺-независимая О-форма (КО) и ксантиндегидрогеназа – NAD⁺-зависимая D-форма (КДГ). При воспалительных процессах, гипоксических состояниях, что свойственно также патогенезу ССД, КДГ трансформируется в КО. КО в процессе своего функционирования генерирует супероксидные радикалы, перекись водорода, гидроперекиси, хлорноватистую кислоту, которые, помимо собственного повреждающего действия на клеточные структуры, активируют НАДФ-оксидазу, являющуюся основным источником образования АФК, инициируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ).

СОД является мощным ингибитором свободнорадикального окисления в организме, защищая биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты и др.) от окислительной деструкции. Синтез ее увеличивается при активации ПОЛ.

В связи с этими открытиями особый интерес представляет изучение активности энзимов, участвующих в процессах эндогенной продукции АФК, а также относящихся к системе антиоксидантной защиты организма.

Цель исследования: описание профиля активности ксантиноксидазы (КО), ксантиндегидрогеназы (КДГ) и супероксиддисмутазы (СОД) в плазме крови больных ССД в зависимости от клинических особенностей.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) на базе ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда. Работа одобрена этическим

комитетом ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского». Исследование включало 51 больного ССД: 47 (92,2%) женщин и 4 (7,8%) мужчин; средний возраст – $41,6 \pm 1,4$ года; средняя продолжительность заболевания – $7,8 \pm 0,8$ лет. Диагноз устанавливался на основе критериев, рекомендованных ACR/EULAR 2013 [12]. Степень активности определялась по классификации, предложенной Н.Г. Гусевой [13]. I степень активности установлена у 19 (37%), II – у 26 (51%) и III – у 6 (12%) больных. В связи с малочисленностью группы больных с 3 степенью активности (6 человек), при оценке внутри- и межгрупповых различий больные с 2 и 3 степенью были объединены в одну группу. Хроническое течение болезни диагностировано у 25 (49%); подострое – у 22 (43,1%); острое – у 4 (7,9%) больных. В связи с малой численностью в данном исследовании лиц с острым течением заболевания, при проведении статистической обработки данных они были объединены в одну группу с больными, имеющими подострое течение ССД. В связи с малочисленностью группы с острым течением заболевания, при проведении статистической обработки данных, она была объединена с группой лиц с подострым течением. Контрольная группа состояла из 30 практически здоровых людей. Статистически значимые различия между основной и контрольной группами по демографическим признакам выявлены не были.

Исследование проводилось на фоне стандартной общепринятой терапии. Забор крови осуществлялся при поступлении пациентов на стационарное лечение.

Спектрофотометрическим методом в плазме крови определяли активность

ксантинооксидазы (КО; Е.С. 1.17.3.2), ксантиндегидрогеназы (КДГ; Е.С. 1.17.1.4) и супероксиддисмутазы (СОД; Е.С. 1.15.1.1) по ранее опубликованным методикам и выражали в нмоль/мин/мл для КО и КДГ и в ЕД для СОД [14, 15].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.0. Полученные данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me , Q_{25} , Q_{75}). Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Для описания взаимосвязи признаков применяли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (ρ). Достоверными различия считались при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе здоровых лиц зависимость активности ферментов от возраста и пола не обнаружена, что позволило не учитывать эти факторы при изучении энзимных показателей у больных ССД. Референтные пределы активности ферментов ($M \pm 2\sigma$) составили: КО – 2,31–4,55 нмоль/мин/мл; КДГ – 3,77–6,61 нмоль/мин/мл; СОД – 3,34–7,46 ЕД.

У больных ССД (группа в целом) по сравнению с референтной группой обнаружено значительное повышение активности всех включенных в исследование энзимов (табл. 1).

У больных ССД с минимальной активностью и в группе больных с хроническим течением заболевания выявлены достоверные различия с референтной группой только для активности КДГ и СОД, а при II–III активности воспалительного процесса и у больных с острым и подострым течением разница была достоверной для активности всех ферментов (табл. 1, 2).

Таблица 1

Активность ферментов в плазме крови у больных ССД в зависимости от активности ($Me(Q_{25}; Q_{75})$)

Группа	Ферменты			Достоверность различий с референтной группой	Достоверность различий между группами больных
	КО	КДГ	СОД		
Здоровые, n = 30	3,5 (3,0; 3,7)	5,3 (4,8; 5,6)	5,5 (5,0; 5,9)		
Больные ССД, n = 51	3,9 (3,5; 4,4)	7,0 (6,5; 7,7)	7,3 (5,9; 8,1)	p < 0,001	
Активность ССД					
I, n = 19	3,6 (3,4; 3,8)	6,4 (6,1; 6,6)	7,7 (6,4; 8,3)	p < 0,001 (для КДГ и СОД)	p < 0,001 (для КО и КДГ)
II, n = 26	4,1 (3,5; 4,5)	7,4 (6,9; 7,7)	7,3 (5,3; 8,1)	p < 0,001	
III, n = 6	4,5 (4,4; 4,6)	8,1 (7,8; 8,3)	6,2 (5,9; 7,4)		

Таблица 2

Активность ферментов в плазме крови больных ССД в зависимости от характера течения (Me(Q₂₅; Q₇₅))

Фермент	Больные ССД				Здоровые, n = 30	p, критерий Манна – Уитни
	Степень активности			Группа в целом, n = 51		
	хроническое, n = 25	подострое, n = 22	острое, n = 4			
КО	3,50 (3,23; 3,79) ²	4,31 (4,11; 4,57)	4,57 (4,48; 4,66)	3,93 (3,50; 4,41) ¹	3,47 (3,04; 3,73) ^{1,2}	¹ p < 0,001 ² p = 0,669
КДГ	6,51 (6,21; 7,09) ²	7,51 (6,95; 7,75)	8,24 (8,10; 8,31)	7,03 (6,51; 7,69) ¹	5,26 (4,81; 5,58) ^{1,2}	¹ p < 0,001 ² p < 0,001
СОД	6,37 (5,29; 7,66) ²	8,01 (7,28; 8,94)	6,92 (6,21; 7,54)	7,32 (5,88; 8,13) ¹	5,46 (4,99; 5,85) ^{1,2}	¹ p < 0,001 ² p = 0,011

Нами изучена зависимость энзимных показателей от активности заболевания и характера течения ССД. В зависимости от активности склеродермического процесса обнаружена сильная корреляция для активности КДГ ($\rho = 0,74$; $p < 0,001$) и корреляция умеренной силы для КО ($\rho = 0,5$; $p < 0,001$). По сравнению с течением сильная корреляция отмечена для активности КО ($\rho = 0,80$; $p < 0,001$). В отношении активности КДГ ($\rho = 0,66$; $p < 0,001$) и СОД ($\rho = 0,42$; $p = 0,002$) имела место взаимосвязь умеренной силы. У больных ССД общей группы и у больных ССД с I, II и III степенью активности в плазме крови наблюдается повышение активности всех трех ферментов. Чем выше степень активности, тем выше активность КО и КДГ. Активность СОД с увеличением степени активности склеродермического процесса снижается, но остается выше, чем в референтной группе. Параллельное увеличение активности КО, КДГ и СОД демонстрирует активацию прооксидантных и антиоксидантных систем. Снижение активности СОД на фоне роста активности заболевания говорит об истощении антиоксидантной защиты организма.

Следует отметить, что хроническое течение ССД, при котором скорость развития тяжелых висцеральных поражений невелика, сопровождалось более низкой активностью КО ($p < 0,001$), КДГ ($p < 0,001$), СОД ($p = 0,003$) по сравнению с более агрессивными (подострым и острым) вариантами течения заболевания. В то же время у больных с острым течением ССД активность СОД была ниже, чем при подостром, практически достигая значений, характеризующих хроническое течение (однако в связи с малым числом больных с острым течением ССД статистическое сравнение между группами на данном этапе исследования не выполнялось).

Таким образом, согласно полученным данным патологический процесс при ССД

сопровождается активацией как ксантиноксидоредуктазы, обладающей прооксидантной активностью, так и СОД, относящейся к системе антиоксидантной защиты. Интенсификация продукции АФК, свободнорадикального окисления, благодаря адаптационным резервам организма, вызывает компенсаторную мобилизацию антиоксидантов. Наибольшая напряженность этих процессов наблюдается при II–III степени активности и подостром-остром течении ССД.

Помимо «окислительного стресса», ассоциированного с АФК, в настоящее время активно обсуждается участие в развитии аутоиммунного воспаления нейтрофильных внеклеточных ловушек (*neutrophil extracellular traps*, NET), продуцируемых нейтрофильными гранулоцитами в ответ на действие эндогенных и экзогенных стимулов, в том числе интерлейкина-8, антител к цитруллинированным белкам, ревматоидному фактору, АФК [11–13]. Изучение NETоза, его взаимосвязи с прооксидантами и компонентами антиоксидантной системы представляет собой одно из перспективных направлений исследований, направленных на уточнение звеньев патогенеза ССД.

Выводы

1. Для ферментного профиля плазмы крови при ССД характерно повышение активности КО, КДГ и СОД, что свидетельствует о росте напряженности оксидантных и антиоксидантных процессов.

2. Увеличение степени активности склеродермического процесса сопровождается снижением активности СОД на фоне роста активности КО и КДГ.

3. В группе больных с подострым и острым течением ССД, в отличие от пациентов с хроническим вариантом течения заболевания, отмечены более высокие показатели активности КО, КДГ, СОД.

Список литературы

1. Denton C.P. Advances in pathogenesis and treatment of systemic sclerosis. *Clin. Med. (Lond)*. 2016. vol. 16 (1). P. 55–60. DOI: 10.7861/clinmedicine.16-1-55.
2. Nihtyanova S.I., Tang E.C., Coghlan J.G., Wells A.U., Black C.M., Denton C.P. Improved survival in systemic sclerosis is associated with better ascertainment of internal organ disease: a retrospective cohort study. *QJM*. 2010. vol. 103. P. 109–115. DOI: 10.1093/qjmed/hcp174.
3. Fuschiotti P. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Immunotargets Ther*. 2016. vol. 11 (5). P. 21–35. DOI: 10.2147/ITT.S82037.
4. Sierra-Sepúlveda A., Esquinca-González A., Benavides-Suárez S.A., Sordo-Lima D.E., Caballero-Islas A.E., Cabral-Castañeda A.R. Systemic Sclerosis Pathogenesis and Emerging Therapies, beyond the Fibroblast. *Biomed Res Int*. 2019. 4569826. [Electronic resource]. URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/4569826> (date of access: 15.09.2019). DOI: 10.1155/2019/4569826.
5. Doridot L., Jeljeli M., Chêne C., Batteux F. Implication of oxidative stress in the pathogenesis of systemic sclerosis via inflammation, autoimmunity and fibrosis. *Redox Biol*. 2019. [Electronic resource]. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231718310917> (date of access: 15.09.2019). DOI: 10.1016/j.redox.2019.101122.
6. Abdulle A.E., Diercks G.F.H., Feelisch M., Mulder D.J., van Goor H. The Role of Oxidative Stress in the Development of Systemic Sclerosis Related Vasculopathy. *Front. Physiol*. 2018. 9:1177. [Electronic resource]. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01177/full> (date of access: 15.09.2019). DOI: 10.3389/fphys.2018.01177.
7. Cracowski J.L., Marpeau C., Carpentier P.H., Imbert B., Hunt M., Stanke-Labesque F., Bessard G. Enhanced in vivo lipid peroxidation in scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum*. 2001. vol. 44 (5). P. 1143–1148.
8. Jones D.P., Sies H. The redox code. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015. vol. 23. No. 9 P. 734–746. DOI: 10.1089/ars.2015.6247.
9. Grygiel-Gómiak B., Puszczewicz M. Oxidative damage and antioxidative therapy in systemic sclerosis. *Mediat. Inflamm*. 2014. DOI: 10.1155/2014/389582.
10. Chapman E.A., Lyon M., Simpson D., Mason D., Beynon R.J., Moots R.J., Wright H.L. Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2019. vol. 10:423. [Electronic resource]. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00423/full> (date of access: 15.09.2019). DOI: 10.3389/fimmu.2019.00423.
11. Guggino G., Pizzo M.L., Liberto D.D et al. Interleukin-9 over-expression and T helper 9 polarization in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2017. vol. 190 (2). P. 208–216. DOI: 10.1111/cei.13009.
12. van den Hoogen F., Khanna D., Fransen J., Johnson S.R., Baron M., Tyndall A. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013. vol. 72. P. 1747–1755. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204424.
13. Гусева Н.Г. Системная склеродермия. М.: Медицина, 1993. 268 с.
14. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. 1983. № 10. С. 30–33.
15. Мартемьянов В.Ф., Мозговая Е.Э., Бедина С.А. Клиническое значение исследования активности ферментов и изоферментов пуринового метаболизма в плазме крови больных анкилозирующим спондилитом // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 12–6. С. 1048–1052.