

С.А. Бедина, Трофименко А.С., Е.Э. Мозговая,
С.С. Спицина, М.А. Мамус, Е.А. Тихомирова

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПРООКСИ- ДАНТНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

DOI 10.25789/YMJ.2020.70.08

УДК 616.72-002.77

Проведены исследования активности энзимов в плазме крови у больных ревматоидным артритом (РА) с различными клиническими проявлениями и анализ зависимости указанных показателей от степени активности воспалительного процесса и наличия системных проявлений заболевания. У больных РА в плазме крови обнаружены существенные изменения активности всех изученных ферментов, имеющие разнонаправленный характер. Активность ксантиноксидазы и супероксиддисмутазы повышена при всех трех степенях активности ревматоидного процесса, а также у больных с суставной формой заболевания и при наличии системных проявлений. Активность ксантиндегидрогеназы повышается при минимальной активности РА и при суставной форме, а у больных с умеренной и высокой активностью и при наличии внесуставных проявлений болезни – снижается. Энзимный профиль плазмы крови при РА характеризуется ростом напряженности окислительных и антиоксидантных процессов.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, плазма крови, ферментный комплекс.

We conducted research of the plasma enzymatic activities in RA patients with different clinical manifestations. The dependence of XO, XDG, SOD activities on RA activity and presence of extra-articular manifestations was analyzed. We have revealed substantial changes in all the plasma enzymatic activities of RA patients. These changes were multidirectional. XO and SOD activities were increased in all RA patients. XO activity have been reached its highest values at maximum disease activity and presence extra-articular involvements, SOD activity – in moderate and high disease activities as well as in patients with articular form of RA. XDG activity was increased at low disease activity and articular form of RA, while moderate, high disease activities and extra-articular involvements were characterized by decreased activity of this enzyme. Plasma enzymatic profile in RA patients is characterized by an increase of an increase in the intensity of oxidative and antioxidant processes.

Keywords: rheumatoid arthritis, plasma, enzymatic profile.

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – иммуновоспалительное (ауто-иммунное) ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением внутренних органов, приводящее к ранней инвалидности и сокращению продолжительности жизни пациентов [6]. Несмотря на достигнутые за последние 50 лет успехи в диагностике и лечении РА, остается еще много нерешенных проблем. Обусловлены они, в первую очередь, тем, что РА продолжает оставаться самым распространенным и дорогостоящим ревматическим заболеванием [10]. Кроме того, в некоторых случаях на фоне приема генно-инженерных биологических препаратов наблюдается прогрессирование ревматоидного

процесса. Исходя из этого, понятен и обоснован интерес современных исследователей к изучению механизмов иммуновоспалительного патогенеза при РА на молекулярно-клеточном уровне. Понимание механизмов, лежащих в основе патогенеза РА, даст возможность улучшить диагностику РА на ранних, доклинических этапах, оценить активность и прогноз заболевания, прогнозировать эффективность лекарственных препаратов, а также, разработать новые и более специфические методы лечения.

В настоящее время нет убедительных доказательств связи РА с каким-то конкретным этиологическим фактором. Предполагают, что в результате сложного взаимодействия генетических факторов и факторов окружающей среды запускается каскад нарушений клеточного и гуморального иммунитета [12]. Эти процессы вызывают не только развитие синовита с последующей деструкцией суставов, но и вовлечение в патологический процесс внутренних органов. Однако механизм, в результате которого первоначальный системный аутоиммунный ответ прогрессирует до специфического воспаления в суставе, остается непонятным. В то же время многочисленные исследования показали, что задолго до появления каких-либо клинических симптомов воспаления в

суставе обнаруживаются антицитруллиновые антитела [11]. Образование аутоантител к цитруллинированным белковым антигенам считается общепризнанным ключевым моментом в патогенезе РА.

Особая роль в индукции и поддержании аутоиммунного воспаления при РА отводится нейтрофильным гранулоцитам. Базируется она на относительно недавно открытой способности нейтрофилов к образованию внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) через особый процесс гибели клеток, называемый NETозом [2, 8, 9, 12, 15].

Антицитруллиновые антитела и воспалительные цитокины (IL-17A, TNF-α и IL-8) стимулируют NETоз. В свою очередь ВНЛ являются источником цитруллинированных аутоантигенов, которые могут быть мишенью для образования антицитруллиновых антител, в результате чего замыкается порочный круг генерации цитруллинированных аутоантигенов и индукции аутоиммунных реакций при РА [12, 13].

Экстрацеллюлярные ловушки представляют собой сетевидные образования, состоящие из нитей деконденсированного хроматина (гистоны и ДНК), компонентов гранул нейтрофилов (нейтрофильная эластаза, миелопероксидаза, катепсин G, лейкоцитарная протеиназа 3, лактоферрин, желатина-

ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского»: БЕДИНА Светлана Александровна – к.м.н., с.н.с., clinicalbiochemistry@yandex.ru, ТРОФИМЕНКО Андрей Степанович – к.м.н., зав. лаб.; ассистент кафедры в Волгоградском ГМУ МЗ РФ, a.s.trofimenko@mail.ru, МОЗГОВАЯ Елена Эдуардовна – к.м.н., в.н.с., СПИЦИНА Светлана Сергеевна – м.н.с.; ассистент кафедры в Волгоградском ГМУ, МАМУС Мария Анатольевна – м.н.с., ТИХОМИРОВА Екатерина Андреевна – м.н.с.

за, лизоцим С, кальпротектин, дефензины и кателицидины), белков цитоскелета (актин, тубулин) [1]. Как правило, процесс формирования ВНЛ сопровождается смертью нейтрофилов. По современным данным, ВНЛ не только инициируют возникновение РА, но и выступают источником аутоагрессии, поддерживающим хроническое аутоиммунное воспаление при РА [12, 15].

Одним из факторов, активизирующим образование ВНЛ, является повышенная продукция активных форм кислорода (АФК) [14]. Основным источником АФК служит НАДФН-оксидаза. Ее роль в инициации процесса образования ВНЛ изучена достаточно. Однако АФК могут образовываться и в ходе других механизмов. Главной системой генерации АФК в организме служит ферментный комплекс ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа. Эти ферменты являются взаимопревращающимися формами ксантин оксидоредуктазы. Ведущая роль в поддержании баланса между ксантиндегидрогеназой (КДГ) и ксантиноксидазой (КО) принадлежит НАДФН-оксидазе. АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой, способствуют трансформации ксантин оксидоредуктазы в оксидазную форму [5]. КО является важнейшим представителем прооксидантной системы организма. Активация КО сопровождается образованием супероксидных радикалов в ходе окисления гипоксантина и ксантина.

Защиту от избытка АФК в организме обеспечивает антиоксидантная система, ключевым ферментным компонентом которой значится супероксиддисмутаза (СОД). В организме здорового человека сохраняется антиоксидантно-прооксидантный баланс. Сбой ан-

тиоксидантной защиты сопровождается стремительным образованием АФК, что влечет за собой «окислительный стресс» и формирование стойкого патологического статуса.

Ввиду того, что АФК генерируют образование ВНЛ, несомненный интерес представляет изучение активности ведущих ферментов прооксидантной и антиоксидантной системы у больных РА.

Цель исследования - описание профиля активности ключевых ферментов прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме крови у больных РА.

Материалы и методы исследования. В исследование был включен 71 больной РА (46 женщин и 25 мужчин; средний возраст $43,2 \pm 3,6$ года; средняя продолжительность заболевания $11,9 \pm 2,6$ года) ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда и 30 практически здоровых людей, составивших контрольную группу. Данные группы были сопоставимы по полу и возрасту. Диагноз устанавливался на основе критериев, рекомендованных ACR/EULAR 2010 [7]. Степень активности определялась с использованием индекса DAS 28. 1-я степень активности установлена у 24 (33,8%), 2-я — у 41 (57,7) и 3-я — у 6 (8,5%) больных. У 30 (42,2%) больных выявлены внесуставные поражения. Преимущественно диагностировалось вовлечение в патологический процесс сердца (30%), легких (23,3) и почек (23,3%). Суставная форма наблюдалась у 41 (57,8%) больного РА. У большинства больных определялась II (36 чел. (50,7%)) и III (27 чел. (38,0%)) рентгенологические стадии поражения суставов, по Штейнброкеру, I — только у 5 (7,0%) пациентов, а IV — у 3 (4,2%).

Ограничение функциональных возможностей суставов наблюдалось в 68 (95,8%) случаях. Первый функциональный класс (ФК-1) установлен у 28 (39,4%) больных, ФК-2 — у 35 (49,3%), ФК-3 — у 5 (7,1%) больных. Серопозитивный (по РФ) РА наблюдался у 48 (67,6%), серонегативный — у 23 (32,4%) больных.

Спектрофотометрическим методом в плазме крови определяли, по ранее опубликованным методикам, активность ксантиноксидазы (КО; Е.С. 1.17.3.2), ксантиндегидрогеназы (КДГ; Е.С. 1.17.1.4) и супероксиддисмутаза (СОД; Е.С. 1.15.1.1) и выражали в нмоль/мин/мл для КО и КДГ и в ЕД для СОД [3, 4].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.0. Полученные данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me, Q25, Q75). Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Достоверными различия считались при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В группе здоровых лиц зависимость активности ферментов от возраста и пола не обнаружена. Данное обстоятельство позволило манкировать этими факторами при изучении энзимных показателей у больных РА. Референтные пределы активности ферментов ($M \pm 2\sigma$) составили: КО — $2,28-5,12$ нмоль/мин/мл, КДГ — $3,96-7,24$ нмоль/мин/мл, СОД — $3,13-6,58$ ЕД.

Нами проведены исследования активности энзимов в плазме крови у больных РА с различными клиническими проявлениями и анализ зависимости указанных показателей от степени активности воспалительного процесса

Активность ферментов в плазме крови у больных РА ($Me(Q_{25}; Q_{75})$)

Группа	Фермент			Достоверность различий с референтной группой	Достоверность различий между группами больных
	КО	КДГ	СОД		
Здоровые, n=30	3,7 ^{1,2,3,4,6,8} (3,2; 4,1)	5,6 ^{2,5,7,9} (4,9; 6,1)	4,9 ^{1,2,3,4,6,8} (4,3; 5,1)		
Больные РА, n=71	6,3 ¹ (4,8; 9,6)	5,5 (4,8; 6,7)	9,2 ¹ (7,3; 11,6)	¹ p<0,001	
Активность РА (степень)					
1-я, n=24	5,3 ^{2,10,11} (4,1; 6,1)	6,9 ^{2,13,14} (6,3; 7,6)	6,7 ^{2,15,16} (5,3; 7,4)	² p<0,001	¹⁰ p<0,001 ¹¹ p<0,001 ¹² p=0,015
2-я, n=41	7,2 ^{3,10,12} (5,0; 10,0)	5,2 ¹³ (4,8; 5,8)	9,9 ^{3,15} (9,0; 13,2)	³ p<0,001	¹³ p<0,001 ¹⁴ p<0,001
3-я, n=6	10,6 ^{4,11,12} (8,3; 11,7)	4,6 ^{5,14} (3,9; 5,2)	11,5 ^{4,16} (9,7; 12,9)	⁴ p<0,001 ⁵ p=0,008	¹⁵ p<0,001 ¹⁶ p<0,001
Форма заболевания					
Суставная, n=41	5,0 ^{6,18} (3,8; 6,2)	6,5 ^{7,19} (5,2; 6,9)	10,5 ^{6,20} (6,7; 13,2)	⁶ p<0,001 ⁷ p=0,011	¹⁸ p<0,001 ¹⁹ p<0,001
Внесуставные поражения, n=30	9,7 ^{8,18} (7,5; 10,8)	5,1 ^{9,19} (4,6; 5,5)	8,4 ^{8,20} (7,5; 9,3)	⁸ p<0,001 ⁹ p=0,025	²⁰ p=0,038

и наличия системных (висцеральных) проявлений заболевания (таблица).

Из данных таблицы видно, что у больных РА в плазме крови обнаружены существенные изменения активности всех изученных ферментов. Эти изменения имеют разнонаправленный характер. Активность КО и СОД повышена при всех трех степенях активности ревматоидного процесса, а также у больных с суставной формой заболевания и при наличии системных проявлений. При этом наибольших значений активность КО достигает при 3-й степени и при развитии висцеральной патологии, а активность СОД – при 2-й-3-й степени активности и при суставной форме. Активность КДГ при минимальной активности РА и при суставной форме повышается, а у больных с умеренной и высокой активностью и при наличии внесуставных проявлений болезни – снижается.

Одновременный рост активности КО и СОД свидетельствует об активации при РА как проокислительных, так и антиокислительных, защитных механизмов организма. Тот факт, что активность СОД в плазме крови значительно ниже при внесуставных поражениях, может свидетельствовать об ослаблении антиокислительной защиты при прогрессировании заболевания и вовлечении висцеральных органов в аутоиммунный ревматоидный процесс. Прогрессирующий рост активности КО на фоне снижения активности КДГ говорит об интенсификации свободнорадикального окисления при более тяжелых формах РА. Можно предположить, что избыточная генерация АФК в результате активации свободнорадикальных реакций у больных РА стимулирует образование ВНЛ нейтрофильными гранулоцитами.

Выводы.

1. При РА имеет место активация ферментных звеньев проокислительной и антиокислительной систем организма.

2. Более тяжелые формы РА сопровождаются интенсификацией процессов свободнорадикального окисления.

3. Развитие висцеральных поражений у больных РА сопровождается истощением механизмов антиокислительной защиты.

Литература

1. Внеклеточные нейтрофильные ловушки и их возможная роль в образовании антицитруллиновых антител при ревматоидном артрите / М.А. Мамус [и др.] // Актуальные проблемы современной ревматологии: сб. науч. работ. / под ред. И.А. Зборовской. - М.: Планета, 2018. - Вып. XXXV. - С. 202-211. DOI: 10.18411/978-5-907109-24-7-2018-xxxv-202-211
2. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии / Н.В. Воробьева, Б.В. Пинегин // Биохимия. - 2014. - Т. 79, № 12. - С. 1580-1591.
3. Dubinina N.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease / N.V. Vorobjeva, B.V. Pinegin // Biochemistry. - 2014. - V. 79. - №. 12. - P. 1580-1591.
4. Дубинина Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лаб. дело. - 1983. - № 10. - С. 30-33.
5. Dubinina E.E. Activity and isozyme spectrum of superoxide dismutase human erythrocytes and blood plasma / E.E. Dubinina, L.A. Salnikova, L.F. Efimova // Lab. Business. - 1983. - № 10. - P. 30-33.
6. Мартеньянов В.Ф. Клиническое значение исследования активности ферментов и изоферментов пуринового метаболизма в плазме крови больных анкилозирующим спондилитом / В.Ф. Мартеньянов, Е.Э. Мозговая, С.А. Бедина // Международ. журнал прикладных и фундамент. исслед. - 2015. - Т. 12. - № 6. - С. 1048-1052.
7. Martemyanov V.F. Clinical significance of research of the activity of enzymes and isozymes of purine metabolism in the blood plasma of patients with ankylosing spondylitis / V.F. Martemyanov, E.E. Mozgovaya, S.A. Bedina // International journal of applied and fundamental research. - 2015. - V. 12. - № 6. - P. 1048-1052.
8. 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. DOI: 10.17802/2306-1278-2014-4-80-94
9. Nadeev A.D. Reactive oxygen species in the

cells of cardiovascular system / A.D. Nadeev, N.V. Goncharov // Complex Issues of Cardiovascular Diseases. - 2014. - № 4. - P. 80-94.

6. Российские клинические рекомендации. Ревматология / под ред. Е.Л. Насонова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 464 с.

Russian Clinical recommendations. Rheumatology / Nasonov E.L., ed. M.: GJeOTAR-Media, 2017. - 464 p.

7. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria. An American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // Arthritis Rheum. - 2010. - V. 62. - P. 2569-2581. DOI: 10.1136/ard.2010.130310.

8. Angelotti F. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis / F. Angelotti [et al.] // Clin.Exp.Rheumatol. - 2017. - V. 35(3). - P. 368-378.

9. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility / C. Sur Chowdhury [et al.] // Arthritis Res Ther. - 2014. - V. 16. - P. R122. - (<https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4579>). DOI: 10.1186/ar4579

10. Ma V.Y. Incidence, prevalence, costs, and impact on disability of common conditions requiring rehabilitation in the United States: stroke, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, limb loss, and back pain / V.Y. Ma, L. Chan, K.J.Carruthers // Arch Phys Med Rehabil. - 2014. - V. 95(5). - P. 986-995. DOI: 10.1016/j.apmr.2013.10.032

11. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis / A.I. Catrina [et al.] // Nat Rev Immunol. - 2017. - V. 13(2). - P. 79-86. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.200.

12. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis / R. Khandpur [et al.] // Sci Transl Med. - 2013. - V. 5(178). - P.178ra40. - (<https://stm.sciencemag.org/content/5/178/178ra40>). DOI: 10.1126/scitranslmed.3005580

13. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs / E. Corsiero [et al.] // Ann Rheum Dis. - 2016. - V. 75. - P. 1866-1875. DOI:10.1136/annrheumdis-2015-208356.

14. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans / W. Stoiber [et al.] // Biomolecules. - 2015. - V. 5. - P. 702-723. DOI: 10.3390/biom5020702.

15. Wright H.L. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis / H.L. Wright, R.J. Moots, S.W. Edwards // Nature Reviews Rheumatology. - 2014. - V. 10(10). - P. 593-601. - (<http://www.nature.com/nrrheum/journal/vaop/ncurrent/full/nrrheum.2014.80.html>). DOI: 10.1038/nrrheum.2014.80.