

## КСАНТИНОКСИДОРЕДУКТАЗА: ЭНЗИМНЫЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

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

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru*

В статье описан энзимный профиль ксантиноксидоредуктазы (КОР) в лимфоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом (РА), включающий активность ксантиноксидазы (КО) и ксантиндегидрогеназы (КДГ). В исследование вошли 77 больных РА и 35 практически здоровых людей, составивших основную и контрольную группу, соответственно. Диагноз РА был верифицирован согласно критериям ACR/EULAR 2010. Оценка активности РА проводилась на основании индекса DAS28. Выделение лимфоцитов проводили по методу А. Бёум с использованием лимфосепа (фирма JCN Biomedicals) с плотностью градиента 1,077-1,079 г/мл. Активность ферментов в лимфоцитах определяли спектрофотометрическим методом: КО – при длине волны 293 нм, КДГ – 340 нм, и выражали в нмоль/мин/мл в пересчете на 10<sup>7</sup> лимфоцитов в 1 мл. Референтный размах (95-перцентильный интервал) для КО – 14,11-31,33 нмоль/мин/мл; для КДГ – 18,62-39,64 нмоль/мин/мл. Энзимный профиль лимфоцитов при РА отличается снижением активности обеих форм КОР (КО и КДГ). Анализ зависимости активности КО и КДГ от индекса DAS28 выявил наличие обратных корреляционных связей высокой степени. Результаты исследования демонстрируют рост напряженности оксидантных процессов в лимфоцитах периферической крови больных РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ксантиноксидоредуктаза, ксантиноксидаза, ксантиндегидрогеназа, лимфоциты.

## XANTHINE OXIDOREDUCTASE: ENZYME PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Spitsina S.S.,  
Zborovskaya I.A.

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

The article describes the enzyme profile of xanthine oxidoreductase (XOR) of peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis patients (RA), including the activity of xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH). The study included 77 RA patients and 35 healthy people, who made up the main and control groups, respectively. Diagnosis of RA had been established using ACR/EULAR 2010 criteria. RA activity was assessed based on the DAS28 index. Lymphocytes were isolated by A. Böyum's method using lymphosep (JCN Biomedicals) with a density gradient of 1.077-1.079 g/ml. Enzyme activity in lymphocytes was determined spectrophotometrically. XO activity was determined at a wavelength of 293 nm, and XDH at 340 nm. The enzyme activities were expressed in nmol/ min/ ml. in terms of 10<sup>7</sup> lymphocytes in 1 ml. The reference range (95th percentile interval) for XO activity was 14.11-31.33 nmol/min/ml; for XDH activity was 18.62-39.64 nmol/min/ml. The enzyme profile of lymphocytes in RA is characterized by a decrease in the activity of both XDH forms (XO and XDH). Analysis of the dependence of the activity of XO and XDH on the DAS28 index revealed the presence of high degree inverse correlations. The results of the study demonstrate an increase in the intensity of oxidative processes in the peripheral blood lymphocytes of RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, xanthine oxidoreductase, xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, lymphocytes.

Ревматоидный артрит (РА) - хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся прогрессирующим симметричным воспалением пораженных суставов, приводящим к разрушению хряща, эрозии костей и инвалидности. В зависимости от пола распространенность заболевания колеблется от 0,4% до 1,3% населения [1]. Напрямую к

летальному исходу РА не приводит, но значительно снижает качество и продолжительность жизни пациентов.

РА характеризуется нарушениями врожденного иммунитета, включая опосредованную иммунным комплексом активацию комплемента, а также адаптивными иммунными ответами против «собственных» антигенов, содержащих преимущественно посттрансляционно модифицированные белки, нарушение регуляции цитокиновых сетей, активацию остеокластов, хондроцитов и импринтинг резидентных стромальных клеток, которые, в свою очередь, поддерживают прогрессирование заболевания [2]. Об участии в развитии РА нарушений регуляции иммунной системы стало известно еще в 40-х годах прошлого столетия после открытия E. Waaler и H.M. Rose антител против иммуноглобулина G, известных как ревматоидные факторы. Однако за последние 50 лет концепция участия иммунного ответа в патогенезе РА получила интенсивное развитие и претерпела значительную модификацию. В настоящее время считается, что в патогенезе ревматоидного процесса доминирует аутореактивность. Хотя и другие механизмы вносят определенный вклад в патогенез заболевания.

РА тесно связан с различными иммунными клетками, и каждый тип клеток по-разному влияет на патогенез заболевания, при этом решающую роль в инициации и хронизации РА в основном играют Т- и В-лимфоциты и макрофаги. Эти клетки могут находиться либо в синовиальной оболочке, либо циркулировать в периферической крови. Активация иммунокомпетентных клеток сопровождается продукцией различных клеточных медиаторов, в том числе и цитокинов, а также антител, образующих с антигеном иммунные комплексы (ревматоидный фактор, антитела к цитруллинированным белкам). На ранних этапах патогенеза РА преобладающими цитокинами являются IL-13, IL-14 и IL-15, секретируемые Т-клетками и стромальными клетками. Иммуновоспалительные клетки, а также иммунные комплексы, циркулирующие в кровеносном русле, оседают и накапливаются в синовиальных тканях, что сопровождается воспалительной реакцией и приводит к прогрессирующему разрушению хрящей и костей. Считается, что поддержание этого воспалительного процесса опосредуется рядом цитокинов: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23 и IFN- $\gamma$  [1; 3].

Доказано, что в модулировании врожденного и адаптивного иммунного ответа центральную роль играют активные формы кислорода и активные формы азота. Влияние активных форм кислорода на иммунные процессы осуществляется, прежде всего, на начальных этапах Т-клеточного иммунного ответа. Кроме того, активированные макрофаги и лимфоциты в синовиальной оболочке через секрецию цитокинов индуцируют

продукцию активных форм кислорода, которые влияют на пролиферацию, дифференциацию Т-клеток и определяют фенотип последних [4].

Более того, накапливающиеся в синовиальных тканях в высоких концентрациях цитокины активируют и вовлекают в воспалительный процесс нейтрофилы и макрофаги, которые, образуя внеклеточные ловушки (NETs и ETs, соответственно) в результате особых процессов гибели клеток (NETos и ETos, соответственно), способствуют дальнейшей генерации свободных радикалов и возникновению окислительного стресса [4].

В последние годы этим процессам придается особое значение в нарушении иммунологической толерантности и поддержании аутоиммунного воспаления при РА. Основывается это на том, что один из компонентов NETs - цитоплазматические и внеклеточные цитруллинированные антигены, связываясь антицитруллинированными антителами, формируют иммунные комплексы, которые являются индукторами дальнейшего NETos при РА [1].

Активация фагоцитарных клеток (нейтрофилов и макрофагов) и образование ими внеклеточных ловушек опосредуется никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидазой (НАДФН-оксидазой), катализирующей восстановление молекулярного кислорода до супероксид-радикала, что сопровождается значительным увеличением потребления кислорода и, как следствие, продукцией супероксид-анионов  $O_2 \cdot^-$ . Активация НАДФН-оксидазы может быть вызвана цитокинами, такими как интерферон, интерлейкины и фактор некроза опухоли- $\alpha$ . Помимо активных форм кислорода, химически активные формы азота, такие как пероксинитритный радикал  $ONOO^-$ , образующийся в результате реакции между  $O_2 \cdot^-$  и оксидом азота, также могут вызывать окислительное повреждение [5].

Относительно недавно было установлено, что НАДФ-оксидаза посредством активных форм кислорода контролирует уникальную ферментную систему – ксантиноксидоредуктазу (КОР; EC 1.17.3.2), стимулируя переход дегидрогеназной формы фермента – ксантиндегидрогеназы (КДГ; E.C. 1.17.1.4) в оксидазную – ксантиоксидазу (КО; E.C. 1.17.3.2) [6]. Несмотря на то что фермент был открыт в 1922 г. Schardinger, интерес ученых к нему не ослабевает и в настоящее время. Хорошо известно, что КОР является прооксидантным ферментом, участвующим в метаболизме пуринов, катализируя превращение гипоксантина и ксантина в мочевую кислоту. В ходе этой реакции образуются активные формы кислорода и активные формы азота, которые могут вызывать окислительный стресс, в том числе после гипоксии/реоксигенации и ишемии/реперфузии – процессов, наблюдаемых при РА [7]. Результаты научных исследований свидетельствуют, что и НАДФ-оксидаза, и КОР активируются свободными радикалами, что дает основание сделать предположение о последовательном функционировании обоих

ферментов. Однако роль КОР в патогенезе РА остается недостаточно изученной. Ранее в своих работах мы изучали активность КОР в плазме. Несомненный интерес представляет исследование активности фермента в лимфоцитах - иммунокомпетентных клетках, принимающих непосредственное участие в патогенезе РА.

Цель исследования – описание профиля активности ксантинооксидазы (КО), ксантиндегидрогеназы (КДГ) в лизатах лимфоцитов больных РА в зависимости от степени активности заболевания.

### Материал и методы исследования

Работа получила одобрение этического комитета ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского». В исследование вошли больные ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда, составившие основную группу, а также доноры станции переливания крови, образовавшие контрольную группу. Диагноз РА был верифицирован согласно критериям, разработанным и утвержденным ACR/EULAR 2010. Оценка активности ревматоидного процесса проводилась на основании индекса Disease Activity Score (DAS28). Активность заболевания расценивалась как низкая ( $DAS28 \leq 3,2$ ), умеренная ( $3,2 > DAS28 \leq 5,1$ ) или высокая ( $DAS28 > 5,1$ ). Демографические параметры обеих групп и клинические параметры больных РА представлены в таблице 1. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Таблица 1

Демографические и клинические параметры контрольной и основной групп

Параметр	Контрольная группа	Основная группа
Группа в целом, n	35	77
Мужчины, n (%)	16 (46)	20 (26)
Женщины, n (%)	19 (54%)	57 (74)
Средний возраст, Me (Q <sub>25</sub> ; Q <sub>75</sub> ), лет	39 (34; 46)	45 (37; 49)
Средняя продолжительность болезни, Me (Q <sub>25</sub> ; Q <sub>75</sub> ), лет	—	8 (6; 10)
Активность заболевания:		
1 степень активности, n (%)	—	
2 степень активности, n (%)	—	16 (21)
3 степень активности, n (%)	—	49 (63)
		12 (16)

Энзимные исследования проводились в лизатах лимфоцитов, источником которых служила венозная кровь, получаемая чаще всего из локтевой вены пациентов в утренние часы до приема пищи. Выделение лимфоцитов проводили по методу А. Вбум с

использованием лимфосепа (фирма JCN Biomedicals) с плотностью 1,077-1,079 г/мл [8]. Жизнеспособность последних оценивали общепринятым методом, окрашивая лимфоциты в 0,2% растворе трипанового синего. Подсчет живых лимфоцитов проводился под микроскопом в камере Горяева по общепринятой методике. Лизаты клеток получали путем смешивания суспензии лимфоцитов с 1% раствором тритона X-100 с последующим трехкратным процессом замораживания-оттаивания. Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом: КО – при длине волны 293 нм, КДГ – 340 нм, и выражали в нмоль/мин/мл в пересчете на  $10^7$  лимфоцитов в 1 мл [9].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0. Для сравнения групп использовали U-test Mann–Whitney. Данные, полученные в ходе статистического анализа, отображали в виде медианы и квартилей: Me, Q<sub>25</sub>, Q<sub>75</sub>. Взаимосвязь признаков описывали с применением рангового коэффициента корреляции Спирмена ( $\rho$ ). Достоверными различия считались при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Референтный размах (95-перцентильный интервал) для КО – 14,11-31,33 нмоль/мин/мл; для КДГ – 18,62-39,64 нмоль/мин/мл.

Активность КО и КДГ в референтной группе не имела зависимости от демографических параметров (пол и возраст). Поэтому эти параметры не принимались во внимание при изучении активности ферментов в основной группе.

Активность ферментов энзимного комплекса КОР у больных РА, как в группе в целом, так и при всех трех степенях активности воспалительного процесса, была значительно ниже по сравнению с контрольной группой. При этом чем выше была активность ревматоидного воспаления, тем больше снижалась активность обеих форм КОР. Результаты анализа отражены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели активности КО и КДГ в лимфоцитах больных РА в зависимости от степени активности воспалительного процесса (Me(Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>))

Группа	Ферменты		p, U-test Mann-Whitney
	КО	КДГ	
Здоровые	20,94 (18,68; 22,67) <sup>1,2,3,4</sup>	29,76 (26,56; 33,70) <sup>8,9,10,11</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,001 <sup>3</sup> p<0,001 <sup>4</sup> p<0,001
РА (группа в целом)	11,70 (9,99; 12,90) <sup>1</sup>	15,21 (12,85; 17,86) <sup>8</sup>	<sup>5</sup> p<0,001 <sup>7</sup> p<0,001 <sup>8</sup> p<0,001 <sup>9</sup> p<0,001

РА, I степень активности	13,40 (12,56; 14,20) <sup>2,5,6</sup>	19,38 (17,97; 20,28) <sup>9,12,13</sup>	<sup>10</sup> p<0,001 <sup>11</sup> p<0,001 <sup>12</sup> p<0,001 <sup>13</sup> p<0,001 <sup>14</sup> p<0,001 <sup>15</sup> p<0,001
РА, II степень активности	10,71 (9,79; 11,41) <sup>3,5,7</sup>	14,87 (14,10; 16,25) <sup>10,12,14</sup>	
РА, III степень активности	7,65 (7,43; 8,09) <sup>4,6,7</sup>	11,10 (10,06; 11,66) <sup>11,13,14</sup>	

Анализ зависимости активности КО и КДГ от индекса DAS28 выявил наличие обратных корреляционных связей высокой степени (табл. 3).

Таблица 3

Зависимость активности КО и КДГ лимфоцитов больных РА от индекса активности  
DAS28

Показатель	ρ, коэффициент корреляции Спирмена	ρ, достоверность корреляции
КО	- 0,809	<0,001
КДГ	- 0,796	<0,001

Проведенные исследования в лизатах лимфоцитов демонстрируют однонаправленные изменения активности обеих форм КОР, заключающиеся в снижении как активности КО, так и КДГ. При этом показатели энзимной активности коррелировали с активностью ревматоидного процесса. Снижение активности ферментов прооксидантного энзимного комплекса в лимфоцитах можно объяснить повышением уровня ферментов в крови в результате увеличения проницаемости клеточных мембран при воспалении и выходом энзимов в периферическое кровеносное русло, что подтверждается увеличением активности КО в плазме крови, продемонстрированном в наших предыдущих исследованиях [10]. Однако повышение содержания энзимов в плазме возможно не только за счет увеличения клеточной проницаемости лимфоцитов, но и за счет перехода ферментов в кровь из органов и тканей, вовлеченных в воспалительный процесс. Долевой уровень ферментов в плазме, обусловленный выходом энзимов из лимфоцитов и органов, требует дополнительного анализа и имеет определенные перспективы для диагностики повреждения органов при РА и выяснения некоторых патогенетических аспектов заболевания.

Увеличение активности оксидазной формы КОР в плазме крови параллельно с уменьшением ее активности в лимфоцитах может свидетельствовать об усилении свободнорадикального окисления и чрезмерной генерации АФК при РА, а снижение

активности дегидрогеназной формы КОР говорит о переходе КДГ в КО. Прогрессирующая трансформация КОР, наблюдаемая с ростом активности РА, вероятно, служит доказательством поддержания окислительного стресса и прогрессирования воспалительного процесса в суставе, который приводит к разрастанию синовиальной оболочки, образованию «паннуса», деградации хряща и костной эрозии [1]. Кроме того, полученные данные дают возможность предположить запуск образования внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами на фоне активации продукции свободных радикалов.

### **Выводы**

1. Энзимный профиль лимфоцитов периферической крови при РА отличается снижением активности обеих форм КОР: КО и КДГ. Увеличение степени активности сопровождается прогрессирующим снижением активности КО и КДГ.
2. Прогрессирование степени активности ревматоидного воспаления сопровождается усугублением свободнорадикального окисления и ростом напряженности оксидантного статуса.

### **Список литературы**

1. Lin Y.J., Anzaghe M., Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020. Vol. 9(4). P. 880. DOI: 10.3390/cells9040880.
2. Firestein G.S., McInnes I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*. 2017. Vol. 46. no. 2. P. 183-196. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.
3. Yap H.Y., Tee S.Z., Wong M.M., Chow S.-K., Peh S.-C., Teow S.-Y. Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development. *Cells*. 2018. Vol. 7 (10). P. 161. DOI: 10.3390/cells7100161.
4. da Fonseca L.J.S., Nunes-Souza V., Goulart M.O.F., Rabelo L.A. Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis: What the Future Might Hold regarding Novel Biomarkers and Add-On Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. 7536805. DOI: 10.1155/2019/7536805.
5. Zeng M.Y., Miralda I., Armstrong C.L., Uriarte S.M., Bagaitkar J. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral. Microbiol.* 2019. Vol. 34 (2). P. 27-38. DOI: 10.1111/omi.12252.
6. McNally J.S., Davis M.E., Giddens D.P., Saha A., Hwang J., Dikalov S., Jo H., Harrison D.G. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. Vol. 285 (6). P. H2290-H2297. DOI: 10.1152/ajpheart.00515.2003.

7. Battelli M.G., Bolognesi A., Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. Vol. 1842 (9). P. 1502-1517. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.022.
8. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: В 2 т. / Под ред. А. И. Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. Т.2. 792 с.
9. Зборовская И.А., Бедина С.А., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э. Влияние обезболивающих препаратов на активность ферментов пуринового метаболизма в плазме крови и лимфоцитах у больных ревматоидным артритом // *Российский журнал боли*. 2018. № 3 (57). С. 47-53. DOI: 10.25731/RASP.2018.03.018.
10. Бедина С.А., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э., Спицина С.С., Мамус М.А., Тихомирова Е.А. Активность ферментов прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме крови больных ревматоидным артритом // *Якутский медицинский журнал*. 2020. № 2 (70). С. 28-30. DOI: 10.25789/YMJ.2020.70.08.