

УДК 616–002.77

## АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО И ПИРИМИДИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ: ЭНЗИМНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИМФОЦИТОВ

© 2019 г. И. А. Зборовская<sup>a, b</sup>, Е. Э. Мозговая<sup>a, \*</sup>,  
А. С. Трофименко<sup>a, b</sup>, С. А. Бедина<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии”, 400138 Волгоград, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Волгоградский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131 Волгоград, Россия

\*e-mail: nauka@pebma.ru

Поступила в редакцию 03.08.2018 г.

После доработки 17.12.2018 г.

Принята к публикации 02.02.2019 г.

Системная склеродермия является тяжелым аутоиммунным заболеванием соединительной ткани. При этом в основе патологического процесса лежат распространенные нарушения микроциркуляции в форме облитерирующего эндартериолита, фиброз кожи и внутренних органов. Несмотря на то, что в настоящее время большинство исследований фокусируются на изучении иммунологических нарушений при системной склеродермии, патогенез данного заболевания включает различные изменения метаболических процессов на клеточном и субклеточном уровне. Пуриновый и пиримидиновый метаболизм представляют собой сложный многоступенчатый каскад ферментных реакций, в ходе которых образуются многочисленные и разнообразные субстраты, выполняющие различные регуляторные и физиологические функции. Патологический процесс при системной склеродермии сопровождается дисбалансом активностей энзимов пуринового и пиримидинового метаболизма. Эти изменения ассоциируются со степенью активности аутоиммунного воспаления и вносят свой вклад в формирование патогенеза заболевания.

**Ключевые слова:** аденозиндезаминаза, аденозинкиназа, гуанилаткиназа, дигидрооротатдегидрогеназа, ИМФ-дегидрогеназа, пуриннуклеозидфосфорилаза, тимидинкиназа, тимидинфосфорилаза, урацил/тимидиндегидрогеназа, цитидиндезаминаза, системная склеродермия, лизаты лимфоцитов, плазма крови

**DOI:** 10.1134/S030117981903010X

### ВВЕДЕНИЕ

Системная склеродермия (ССД) является аутоиммунным заболеванием соединительной ткани, основные клинические признаки которого обусловлены распространенными нарушениями микроциркуляции, фиброзом кожи и внутренних органов [12].

Ранняя диагностика и адекватная индивидуальная терапия с учетом клинической формы, течения заболевания, характера и степени выраженности ишемических и висцеральных поражений в значительной степени определяют эффективность лечения и прогноз ССД. Согласно современным подходам, основными направлениями ее медикаментозного лечения являются сосудистая, противовоспалительная и антифиброзная терапия, лечение висцеральных проявлений [12]. В то же время,

несмотря на определенные успехи терапевтических мероприятий, средняя продолжительность жизни с момента начала заболевания составляет всего 11 лет, при этом смертность среди больных ССД гораздо выше, чем при других аутоиммунных ревматических болезнях [14]. В связи с этим сохраняется актуальность продолжение углубленного изучения патогенеза ССД с целью поиска дополнительных диагностических тестов, отражающих минимальную активацию иммуновоспалительного процесса, новых мишеней для последующей разработки методов терапевтического воздействия.

В настоящее время ССД рассматривается в качестве природной модели генерализованного фиброза и характеризуется распространенными вазоспастическими нарушениями по типу син-

дрома Рейно, в основе которых лежат поражение соединительной ткани с преобладанием фиброза и сосудистая патология в форме облитерирующего эндартериолита. [8]. Считается, что ССД развивается под влиянием ряда эндогенных и экзогенных факторов. Около 50–70% варибельности клинических фенотипов заболевания определяется генетическими особенностями, связанными с главным комплексом гистосовместимости (антигенами класса HLA-II) и полиморфными вариантами большого числа других генов (FAS и др.) [9, 34] В патогенезе ССД ключевую роль играют иммунная активация, повреждение сосудистого эндотелия и повышение синтетической функции фибробластов [18, 28, 30].

### РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

В настоящее время большинство исследований фокусируются на изучении иммунологических нарушений при ССД. В то же время патогенез аутоиммунных заболеваний, к которым относятся ССД, включает различные изменения метаболических процессов на клеточном и субклеточном уровне, медиаторами которых являются ферменты. Биохимические реакции, составляя материальную основу всех функциональных процессов организма, выполняют адаптационную, гомеостатическую роль. В ряде работ сообщается о различных метаболических нарушениях при ССД. Обратимое фосфорилирование остатков тирозина в ответ на факторы роста и другие стимулы регулирует аутоиммунитет, васкулопатию и фиброз. [43]. Распространенный фиброз сопровождается аномалиями метилирования ДНК [24], дисрегуляцией активности серин-треониновых киназ [41], нарушением экспрессии матриксных металлопротеиназ [40]. Асимметричный диметиларгинин в качестве эндогенного ингибитора синтазы оксида азота может провоцировать воспалительный синдром и эндотелиальную дисфункцию при системном склерозе [46]. Чрезмерный синтез лейкотриенов способствует развитию и прогрессированию ССД [21]. Среди различных аутоантител, направленных против ядерных, цитоплазматических и внеклеточных аутоантигенов, при ССД выявляются также антитела к ферментам пуринового метаболизма [1, 37].

### ПУРИНОВЫЙ И ПИРИМИДИНОВЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Метаболизм пуриновых и пиримидиновых производных представляет собой сложный многоступенчатый каскад ферментных реакций, в ходе которых образуются многочисленные и разнообразные субстраты, выполняющие различные

регуляторные и физиологические функции. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды необходимы для синтеза нуклеиновых кислот. Пуриновые нуклеотиды участвуют в процессах энергопродукции, регуляции кровообращения и сосудистого тонуса, пластических процессах, входят в состав коферментов (НАД, НАДФ, ФАД). Они выступают в роли акцепторов в реакциях окислительного фосфорилирования, оказывают влияние на проницаемость клеточных мембран, транспорт ионов кальция, секрецию простагландинов, свертываемость крови, являются аллостерическими регуляторами активности ряда ферментов [5]. Длительная тканевая гипоксия неизбежно ведет к перестройке метаболизма пуринов по катаболическому пути, при этом концентрация пуриновых метаболитов коррелирует со степенью тяжести ишемии [17]. Хорошо известно, что изменения в ферментных системах, обеспечивающих обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, могут нарушать процессы пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, отвечающих за выработку антител и иммунологическую реактивность, внося определенный вклад в инициацию, поддержание, развитие патологического процесса [7].

Представленные в литературе результаты изучения изменений в ферментных системах обмена нуклеиновых кислот при ССД немногочисленны. Однако эти данные убедительно свидетельствуют о вовлечении их метаболитов и энзимов в патогенез ССД. В частности, повышенный уровень мочевой кислоты (МК) ассоциируется с выраженным микрососудистым повреждением [29], ослаблением эндотелий-опосредованной релаксации, жесткостью сосудистой стенки [45] и диастолической дисфункцией левого желудочка [31]. Уровень МК имеет прогностическое значение при легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), развивающейся на фоне ССД: низкая концентрация МК в сыворотке крови связана с низким уровнем риска ЛАГ [22]. При этом уровень сывороточной МК повышается пропорционально клинической тяжести ЛАГ [23]. Ряд исследователей в эксперименте подтвердили гипотезу об опосредовании кожного фиброза аденозином [20, 25]. Свободная гуанилатциклаза, стимуляция которой ведет к повышению уровня цГМФ, обладает способностью ингибировать экспериментальный фиброз, а также демонстрирует позитивный клинический эффект в отношении ЛАГ [19]. Учитывая вышеизложенное, особый интерес представляет изучение при ССД изменений активности комплекса энзимов, регулирующих обмен пуриновых и пиримидиновых метаболитов.

## ПРОФИЛЬ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО И ПИРИМИДИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ (АНАЛИЗ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ)

Нами было проведено исследование активности ферментов пуринового (аденозиндезаминаза (АДА), ЕС 3.5.4.4; аденозинкиназа (АК), ЕС 2.7.1.20; гуанилаткиназа (ГК), ЕС 2.7.4.8.; ИМФ-дегидрогеназа (ИМФДГ), ЕС 1.1.1.205; пуриинуклеозидфосфорилаза (ПНФ) ЕС 2.4.2.1) и пиримидинового (дигидрооротатдегидрогеназа (ДОДГ), ЕС 1.3.1.14; тимидинкиназа (ТК), ЕС 2.7.1.21; тимидинфосфорилаза (ТФ), ЕС 2.4.2.4; урацил/тимидиндегидрогеназа (УДГ), ЕС 1.17.99.4; цитидиндезаминаза (ЦДА) ЕС 3.5.4.5) метаболизмов в плазме и лизатах лимфоцитов периферической крови больных ССД. Представляем результаты анализа профиля активностей комплекса ферментов пуринового и пиримидинового метаболизмов в плазме и лизатах циркулирующих лимфоцитов при ССД, а также его взаимосвязи с клинико-иммунологическими особенностями данного заболевания.

Исследование проводилось в соответствии с общепринятыми этическими принципами на базе ревматологического отделения ГУЗ “ГКБСМП № 25” г. Волгограда. В исследование был включен 51 больной ССД. Диагноз ССД устанавливался в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов и Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR 2013) [32]. Среди больных ССД было 47 (92.2%) женщин и 4 (7.8%) мужчин. Средний возраст больных составил  $42.8 \pm 1.3$  года; средняя продолжительность заболевания —  $7.9 \pm 0.7$  лет.

Среди включенных в исследование пациентов наблюдались все варианты течения ССД [12, 15]: у 14 (27.5%) — хроническое (медленно прогрессирующее) течение, при котором скорость развития тяжелых висцеральных поражений невелика, у 22 (43%) — подострое течение с умеренным темпом прогрессирования, и у 15 (29.5%) больных — острое течение с наиболее быстрым формированием генерализованного фиброза. В то же время, активность ССД, оцениваемая главным образом по выраженности текущих клинико-лабораторных проявлений аутоиммунного воспаления [3], также демонстрировала значительную вариабельность. Минимальная (I) степень активности имела место в 14 (27.5%), II степень — в 27 (52.9%), III степень — в 10 (19.6%) наблюдениях. При этом в большинстве случаев хронического течения ССД лабораторные показатели иммуно-воспалительного ответа были мало изменены, тогда как при подостром (умеренно прогрессирующем) и остром (быстро прогрессирующем), течении ССД преобладает умеренная и высокая активность процесса. Контрольную группу составили 30 практически здо-

ровых людей. Статистически значимых различий между основной и контрольной группами по демографическим признакам выявлено не было.

Исследование проводилось на фоне стандартной общепринятой терапии. Забор крови осуществлялся при поступлении пациентов на стационарное лечение. Активность ферментов исследовали в плазме и лизатах лимфоцитов периферической крови в день ее забора. Выделение лимфоцитов из венозной крови проводилось по методике А. Вёрум [10] методом дифференциального центрифугирования с использованием препарата “Лимфосеп” (MP Biomedicals LLC, США) в градиенте плотности 1.077–1.079 г/мл. Лизаты лимфоцитов готовили путем замораживания—оттаивания с последующим центрифугированием. Активности ферментов определяли спектрофотометрическим методом по ранее описанным методикам: АДА [36]; АК [34], ГК [38], ДОДГ [27], ИМФДГ [34], ПНФ [42], ТК [44], ТФ [26], УДГ [34], ЦДА [47]. Активность энзимов в лизатах лимфоцитов нормировали из расчета на содержание лимфоцитов до лизиса  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Активность ферментов в плазме крови и лизатах лимфоцитов выражали в нмоль/мин/мл.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета “Statistica 6.0”. Результаты выражали как среднее арифметическое  $\pm$  среднее квадратическое отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Подбор критериев для сравнения групп осуществляли по общепринятым правилам. Для описания взаимосвязи признаков применяли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену ( $\rho$ ). Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

Согласно полученным данным, в группе практически здоровых лиц не было выявлено зависимости энзимных показателей от пола и возраста. В связи с этим данные факторы при анализе изменений активности ферментов у больных ССД не учитывались. Референтные пределы активности включенных в исследование энзимов ( $M \pm 2\sigma$ ) представлены в табл. 1.

У больных ССД (группа в целом) были выявлены значительные изменения активности включенных в исследование энзимов пуринового и пиримидинового метаболизма. Так, при ССД по сравнению с референтной группой в плазме крови (табл. 2) обнаружена более высокая активность ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, ТФ, УДГ; отличия в активности остальных ферментов были незначительными. В лизатах лимфоцитов (табл. 3) наблюдали повышение активности АК, ИМФДГ и ТК, снижение активности АДА, ГК, ПНФ.

Учитывая, что показатели активности ферментов являются чувствительными индикаторами воспалительных и дистрофических процессов [2], а ССД сопровождается явлениями иммунного воспаления, которое может оказать влияние на формирование энзимного профиля крови, изме-

**Таблица 1.** Референтные пределы активности ферментов в плазме крови и лизатах лимфоцитов

Фермент	Референтные пределы активности ферментов	
	плазма крови (нмоль/мин/мл)	лизаты лимфоцитов (нмоль/мин/мл)
АДА	5.54–8.86	38.35–47.91
АК	7.85–9.69	15.36–22.96
ГК	2.22–5.66	2.76–10.68
ДОДГ	1.44–5.16	2.29–6.33
ИМФДГ	1.49–2.97	1.28–6.4
ПНФ	0.18–1.98	26.91–40.47
ТК	0.4–0.96	1.55–2.71
ТФ	0.41–1.17	2.23–4.43
УДГ	0.25–1.21	2.63–5.07
ЦДА	0.33–1.29	2.15–4.95

нения активности ферментов были рассмотрены в зависимости от степени активности патологического процесса.

У больных ССД с I степенью активности в сравнении с контролем наблюдали: в плазме крови повышение активности АДА, ТФ, снижение активности АК (табл. 2); в лизатах лимфоцитов – снижение активности АДА, ПНФ, повышение активности АК, ИМФДГ, ТК (табл. 3).

В подгруппе больных ССД со II степенью активности в отличие от контроля в плазме крови была выше активность ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, ТФ, УДГ (табл. 2); в лизатах лимфоцитов – ниже активность АДА, ГК, ПНФ, выше активность АК, ИМФДГ, ТК (табл. 3).

У пациентов с III степенью активности патологического процесса по сравнению с группой

контроля в плазме крови выявлено повышение активности АК, ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, УДГ, снижение – АДА (табл. 2); в лизатах лимфоцитов – снижение активности АДА, ГК, ПНФ, УДГ, повышение активности АК, ИМФДГ, ТК (табл. 3).

Нами выявлена зависимость энзимных показателей от степени активности ССД. Сильные корреляции обнаружены для плазменной активности АДА ( $\rho = -0.91; p < 0.001$ ), АК ( $\rho = 0.91; p < 0.001$ ), ИМФДГ ( $\rho = 0.79; p < 0.001$ ), ПНФ ( $\rho = 0.84; p < 0.001$ ); активности АДА ( $\rho = -0.91; p < 0.001$ ), ТК ( $\rho = 0.82; p < 0.001$ ) лизатов лимфоцитов (рис. 1–2). В отношении активности ГК ( $\rho = -0.36; p = 0.01$ ), ДОДГ ( $\rho = 0.50; p < 0.001$ ), ТК ( $\rho = 0.74; p < 0.001$ ), ТФ ( $\rho = -0.55; p < 0.001$ ), УДГ ( $\rho = 0.64; p < 0.001$ ) плазмы крови, активности ДОДГ ( $\rho = -0.40; p = 0.004$ ), ИМФДГ

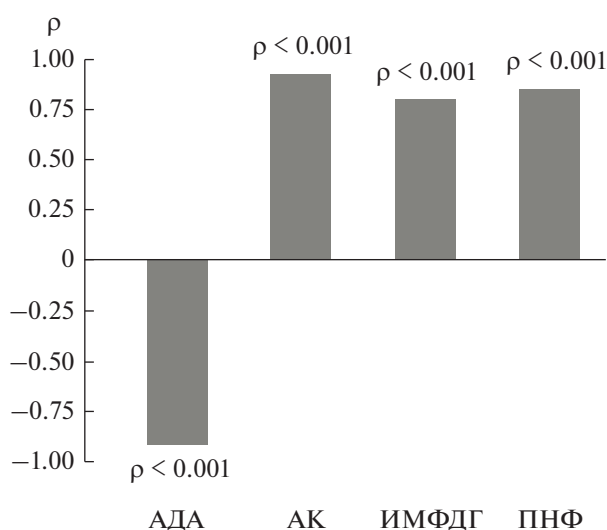
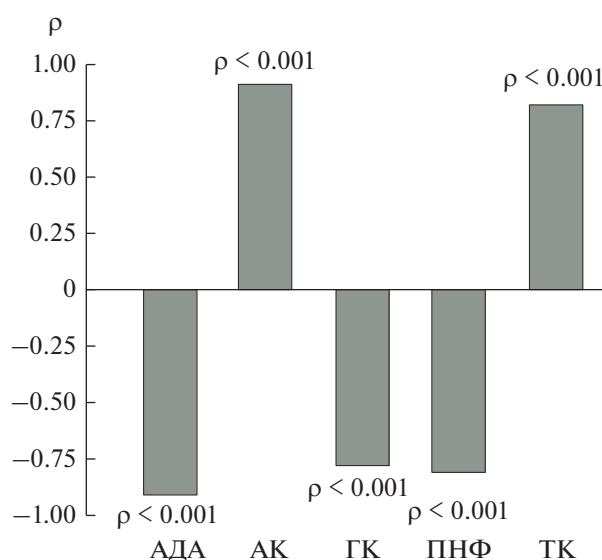
**Рис. 1.** Зависимость энзимных показателей плазмы крови от степени активности ССД.**Рис. 2.** Зависимость энзимных показателей лимфоцитов от степени активности ССД.

Таблица 2. Активность ферментов в плазме крови больных ССД

Фермент	Больные ССД				Здоровые	p, непарный критерий Стьюдента
	степень активности			группа в целом		
	I	II	III			
АДА	7.79 ± 0.12 <sup>2</sup>	7.03 ± 0.15	6.43 ± 0.13 <sup>1</sup>	7.12 ± 0.49	7.2 ± 0.83 <sup>1.2</sup>	<sup>1</sup> p = 0.006 <sup>2</sup> p = 0.012
АК	7.87 ± 0.31 <sup>1</sup>	8.86 ± 0.31	10.27 ± 0.24 <sup>2</sup>	8.87 ± 0.87	8.77 ± 0.46 <sup>1.2</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p < 0.001
ГК	4.09 ± 0.40	3.86 ± 0.36	3.65 ± 0.24	3.88 ± 0.38	3.94 ± 0.86	
ДОДГ	3.67 ± 0.12	3.88 ± 0.25 <sup>2</sup>	3.9 ± 0.08 <sup>3</sup>	3.83 ± 0.22 <sup>1</sup>	3.30 ± 0.92 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p = 0.002 <sup>3</sup> p = 0.048
ИМФДГ	2.37 ± 0.24	3.06 ± 0.33 <sup>1</sup>	3.45 ± 0.24 <sup>2</sup>	2.95 ± 0.48 <sup>3</sup>	2.23 ± 0.37 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p < 0.001 <sup>3</sup> p < 0.001
ПНФ	0.95 ± 0.07	1.29 ± 0.19 <sup>1</sup>	1.67 ± 0.11 <sup>2</sup>	1.27 <sup>3</sup> ± 0.29	0.82 ± 0.32 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p < 0.001 <sup>3</sup> p < 0.001
ТК	0.72 ± 0.08	0.88 ± 0.15 <sup>1</sup>	1.09 ± 0.06 <sup>2</sup>	0.88 ± 0.17 <sup>3</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p < 0.001 <sup>3</sup> p < 0.001
ТФ	0.96 ± 0.08 <sup>2</sup>	0.9 ± 0.18 <sup>3</sup>	0.74 ± 0.05	0.89 ± 0.15 <sup>1</sup>	0.79 ± 0.19 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.01 <sup>2</sup> p = 0.002 <sup>3</sup> p = 0.02
УДГ	0.81 ± 0.07	0.87 ± 0.09 <sup>3</sup>	1.05 ± 0.04 <sup>1</sup>	0.89 ± 0.12 <sup>2</sup>	0.73 ± 0.24 <sup>1.2.3</sup>	<sup>1</sup> p < 0.001 <sup>2</sup> p < 0.001 <sup>3</sup> p = 0.005
ЦДА	0.88 ± 0.16	0.86 ± 0.19	0.94 ± 0.08	0.88 ± 0.16	0.81 ± 0.24	

(p = 0.52; p < 0.001), ТК (p = 0.82; p < 0.001), ТФ (p = -0.57; p < 0.001), УДГ (p = -0.55; p < 0.001), ЦДА (p = -0.55; p < 0.001) лизатов лимфоцитов имела место взаимосвязь умеренной силы.

Таким образом, у больных ССД нарастание активности патологического процесса сопровождалось в плазме крови повышением активности АК, ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, УДГ, снижением активности АДА, ГК, ТФ; в лизатах лимфоцитов повышением активности АК, ИМФДГ, ТК, снижением активности АДА, ГК, ДОДГ, ПНФ, ТФ, УДГ, ЦДА.

Следует отметить, что включенные в исследование энзимные тесты являются неспецифическими маркерами системного воспалительного процесса [2]. Нами был проведен анализ индивидуальных значений энзимных показателей у

больных ССД с I степенью активности. Было выявлено, что за верхний референтный предел активность ПНФ плазмы крови выходила в 42.9%, активность АК лизатов лимфоцитов – в 100% наблюдений. Плазматическая активность АК была ниже нормы у 50%, активность АДА лизатов лимфоцитов – у 100% больных. Эти результаты сравнимы с данными, полученными для традиционных острофазовых показателей. От уровня нормы СРБ и ЦИК отклонялись в 44.4%, IgG – в 29.4%, IgM – в 33.3%, фибриноген, IgA – в 27.8%, АНФ – в 22.2% случаев. Характерно, что в лизатах лимфоцитов активность АДА составляла при I степени активности 34.97–36.25 нмоль/мин/мл, при II – 28.07–31.51 нмоль/мин/мл, при III – 22.24–24.28 нмоль/мин/мл. Активность АК в той же среде имела значения: при I степени активности 23.43–

**Таблица 3.** Активность ферментов в лизатах лимфоцитов больных ССД

Фермент	Больные ССД				Здоровые	<i>p</i> , непарный критерий Стьюдента
	степень активности			группа в целом		
	I	II	III			
АДА	35.61 ± 0.32 <sup>1</sup>	29.79 ± 0.86 <sup>2</sup>	23.26 ± 0.51 <sup>3</sup>	30.11 ± 4.29 <sup>4</sup>	43.13 ± 2.39 <sup>1,2,3,4</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>2</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>3</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>4</sup> <i>p</i> < 0.001
АК	24.25 ± 0.41 <sup>1</sup>	28.26 ± 0.43 <sup>2</sup>	32.53 ± 0.28 <sup>3</sup>	28.0 ± 2.87 <sup>4</sup>	19.16 ± 1.90 <sup>1,2,3,4</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>2</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>3</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>4</sup> <i>p</i> < 0.001
ГК	6.46 ± 0.43	5.66 ± 0.52 <sup>2</sup>	4.92 ± 0.15 <sup>1</sup>	5.74 ± 0.69 <sup>3</sup>	6.72 ± 1.98 <sup>1,2,3</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> = 0.007 <sup>2</sup> <i>p</i> = 0.01 <sup>3</sup> <i>p</i> = 0.02
ДОДГ	4.31 ± 0.20	4.1 ± 0.39	4.0 ± 0.14	4.14 ± 0.33	4.31 ± 1.01	
ИМФДГ	4.59 ± 0.19 <sup>4</sup>	5.03 ± 0.41 <sup>1</sup>	5.04 ± 0.24 <sup>3</sup>	4.91 ± 0.39 <sup>2</sup>	3.84 ± 1.28 <sup>1,2,3,4</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>2</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>3</sup> <i>p</i> = 0.006 <sup>4</sup> <i>p</i> = 0.036
ПНФ	30.17 ± 1.21 <sup>1</sup>	27.75 ± 1.59 <sup>2</sup>	24.21 ± 0.43 <sup>3</sup>	27.72 ± 2.42 <sup>4</sup>	33.69 ± 3.39 <sup>1,2,3,4</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>2</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>3</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>4</sup> <i>p</i> < 0.001
ТК	2.43 ± 0.10 <sup>1</sup>	2.62 ± 0.11 <sup>2</sup>	2.91 ± 0.09 <sup>3</sup>	2.63 ± 0.19 <sup>4</sup>	2.13 ± 0.29 <sup>1,2,3,4</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>2</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>3</sup> <i>p</i> < 0.001 <sup>4</sup> <i>p</i> < 0.001
ТФ	3.36 ± 0.11	3.21 ± 0.25	3.06 ± 0.07	3.22 ± 0.22	3.33 ± 0.55	
УДГ	4.06 ± 0.31	3.90 ± 0.54	3.23 ± 0.24 <sup>1</sup>	3.81 ± 0.53	3.85 ± 0.61 <sup>1</sup>	<sup>1</sup> <i>p</i> = 0.004
ЦДА	3.60 ± 0.24	3.29 ± 0.20	3.19 ± 0.15	3.36 ± 0.25	3.55 ± 0.70	

25.07 нмоль/мин/мл, при II – 27.4–29.12 нмоль/мин/мл, при III – 31.97–33.09 нмоль/мин/мл. Вероятно, такие энзимные показатели, как активность АДА и АК плазмы крови и лизатов лимфоцитов могут быть рассмотрены в дальнейшем в качестве маркеров – кандидатов активности ССД.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным патологический процесс при ССД сопровождается дисбалансом активностей энзимов пуринового и пиримидинового метаболизма. Эти изменения ассоциируются со степенью активности аутоиммунного воспа-

ления и вносят свой вклад в формирование патогенеза заболевания.

ССД характеризуется широким спектром разнообразных нарушений клеточного и гуморального иммунитета: Т-клеточная активация, дисрегуляция в системе Th<sub>1</sub>–Th<sub>2</sub>-клеток, повышение уровня отдельных цитокинов, наличие специфических антинуклеарных и антинуклеолярных антител – антицентромерных, антитопоизомеразных, РНК-антител, АНЦА, антител к эндотелию, различным компонентам соединительной ткани, энзимам [13, 37]. Доказана патогенетическая роль Т-клеточных нарушений, их влияние на развитие сосудистой патологии и фиброза при ССД. [13]. Можно предположить, что определенный вклад в

реализацию этих процессов, вносят также изменения метаболического уровня.

Выявленное нами снижение активности АДА, более выраженное при высокой активности склеродермического процесса, ведет к накоплению в лимфоцитах аденозина. Согласно данным литературы, аденозин вызывает замедление биосинтеза РНК, ДНК в лимфоцитах, их гибель или усиленный апоптоз, особенно Т-лимфоцитов, нарушения процессов пролиферации, угнетение супрессорной и киллерной функций, индуцирует повышение синтеза фактора некроза опухоли альфа [16]. При этом компенсаторный механизм утилизации повышенных концентраций аденозина, реализующийся через повышение активности АК, АМФ-деаминазы [4], ИМФДГ, что косвенно подтверждается снижением активности 5'-НТ [6], вероятно не может в полной мере нивелировать возникающий дисбаланс.

Дефицит активности ПНФ в лимфоцитах, нарастающий с увеличением степени активности ССД, приводит к накоплению в них дезоксирибозина. Этот метаболит нарушает процессы пролиферации и дифференциации лимфоцитов, опосредует потерю Т-лимфоцитами иммуносупрессорного воздействия на В-лимфоциты, а также других присущих им функциональных свойств, что может обусловить нарушение кооперативных взаимодействий клеток иммунной системы [33, 39].

Изменения процессов селекции иммунокомпетентных клеток, их поликлональной и клональной активации, созревания аффинности вырабатываемых антител, могут быть обусловлены в том числе выявленным нами снижением активности ЦДА, являющейся индуктором соматических гипермутаций генов иммуноглобулинов [11].

Полученные данные о росте активности лимфоцитарной ТК служат косвенным подтверждением интенсификации образования дезокситимидинмонофосфата (дТМФ) через "запасной" путь синтеза, что характерно для подготовки быстро делящихся клеток к синтезу ДНК и согласуется с представлениями о сопровождающей развитие ССД активации лимфоцитов.

Таким образом, выявленные в выполняющих узкоспециальные функции лимфоцитах многочисленные изменения активности ферментов, ответственных за обмен нуклеиновых кислот, могут вносить существенный вклад в прогрессирование ССД.

Энзимный профиль плазмы крови при ССД характеризуется повышением активности ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, ТФ, УДГ; энзимный профиль лизатов лимфоцитов — повышением активности АК, ИМФДГ и ТК, снижением активности АДА, ГК, ПНФ.

Активность иммунного воспаления при ССД прямо коррелирует с плазменной активностью

АК, ДОДГ, ИМФДГ, ПНФ, ТК, УДГ, активностью АК, ИМФДГ, ТК лизатов лимфоцитов; обратнo коррелирует с плазменной активностью АДА, ГК, ТФ, активностью АДА, ГК, ДОДГ, ПНФ, ТФ, УДГ, ЦДА лизатов лимфоцитов.

Изменения активности ферментов, регулирующих обмен нуклеотидов, составляют некоторые патогенетические звенья ССД, способствуя формированию характерных для данного заболевания особенностей метаболизма.

Выработка новых подходов к лечению ССД, основанных на коррекции нарушенных звеньев пуринового и пиримидинового метаболизма, может рассматриваться в качестве одного из перспективных путей повышения эффективности лечения данного заболевания.

Сегодня воздействие на ферменты нуклеинового обмена находится в фокусе внимания при разработке лекарственных препаратов цитостатического действия, применяемых для лечения аутоиммунных заболеваний. В то же время определенные перспективы в лечении ревматических болезней, вероятно, может иметь таргетная коррекция метаболических нарушений, направленная на нормализацию уровня пуриновых и пиримидиновых метаболитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Александрова Н.В., Бенедикция Е.В., Александров А.В. и др.* Клинико-диагностическое значение антител к ферментам пуринового метаболизма для определения активности патологического процесса при системной красной волчанке и системной склеродермии // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 8—2. С. 274—278.
2. *Вилкинсон Д.* Принципы и методы диагностической энзимологии. М.: Медицина, 1981. 624 с.
3. *Гусева Н.Г.* Системная склеродермия. М.: Медицина, 1993. 268 с.
4. *Зборовский А.Б., Абрамов Н.Б.* Клинико-диагностическое значение активности ферментов аденилового пула пуринового метаболизма в лимфоцитах и эритроцитах больных системной склеродермией // *Вестник ВолГМУ*. 2008. № 4. С. 71—74.
5. *Зборовский А.Б., Мартымянов В.Ф., Мозговая Е.Э. и др.* Клинико-патогенетическое значение исследования активности ферментов пуринового метаболизма при ревматоидном артрите // *Український ревматологічний журнал*. 2001. № 3—4 (5—6). С. 64—67.
6. *Карпова О.В., Рыбак В.А.* Клиническое значение исследования активности ферментов пуринового метаболизма у больных системной склеродермией // *Вестник ВолГМУ*. 2007. № 1. С. 62—66.
7. *Клиническая иммунология и аллергология* / Под ред. Л. Йоира. М.: Медицина, 1990. Т. 1. 526 с.
8. *Клиническая ревматология* / Под ред. В.И. Мазурова. СПб.: Фолиант, 2005. 520 с.
9. *Крылов М.Ю., Ананьева Л.П., Конева О.А. и др.* Полиморфизм (–670A/G) гена апоптоза FAS ассоции-

- ирован с клиническими фенотипами системной склеродермии в российской популяции: пилотное исследование // Научно-практическая ревматология. 2017. Т. 55. № 1. С. 37–40.
10. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 2002. 600 с.
  11. Павлов К.И., Титов Л.П., Гончаров А.Е., Янович О.А., Жаворонок С.В. Цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза – ферменты, контролирующие интенсивность специфичности иммунного ответа: стандартизация активности в норме и диагностическая значимость при заболеваниях // Медицинский журнал. 2014. № 4. С. 98–103.
  12. Ревматология: клинические рекомендации / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. 752 с.
  13. Ревматология: национальное руководство / Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. 720 с.
  14. Саад Е.О., Ананьева Л.П., Алекперов Р.Т. и др. Структурные и функциональные изменения по данным эхокардиографии больных системной склеродермией и вариабельность ритма сердца // Научно-практическая ревматология. 2017. Т. 55. № 1. С. 32–36.
  15. Сигидин Я.А., Гусева Н.Г., Иванова М.М. Диффузные болезни соединительной ткани. М.: Медицина, 1994. 544 с.
  16. Филановская Л.И., Блинов М.Н. Ферменты обмена пуриновых нуклеотидов как биохимические маркеры дифференцировки нормальных и лейкозных клеток (обзор литературы) // Вопр. мед. химии. 1986. Т. 32. № 6. С. 10–16.
  17. Шилова Л.Н., Зборовская И.А., Гонтарь И.П. Антитела к ферментам пуринового метаболизма при системной склеродермии // Сибирский медицинский журнал. 2007. № 7. С. 72–73.
  18. Bergmann C., Distler J.H. Epigenetic factors as drivers of fibrosis in systemic sclerosis // Epigenomics. 2017. V.9. № 4. P. 463–477.
  19. Beyer C., Zenzmaier C., Palumbo–Zerr K. et al. Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non–canonical TGFβ signaling // Ann. Rheum. Dis. 2015. V. 74(7). P. 1408–1416.
  20. Chan E.S., Liu H., Fernandez P. et al. Adenosine A2A receptors promote collagen production by a Fli1– and CTGF-mediated mechanism // Arthritis research & therapy. 2013. V. 15. № 3. R58.
  21. Chwieśko–Minarowska S., Kowal K., Bielecki M., Kowal–Bielecka O. The role of leukotrienes in the pathogenesis of systemic sclerosis // Folia Histochem. Cytobiol. 2012. V. 50. № 2. P. 180–185.
  22. Coghlan J.G., Denton C.P., Grünig E. et al. Evidence–based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study // Ann. Rheum. Dis. 2014. V. 73. P. 1340–1349.
  23. Dimitroulas T., Giannakoulas G., Dimitroula H. et al. Significance of serum uric acid in pulmonary hypertension due to systemic sclerosis: a pilot study // Rheumatol. Int. 2011. V. 31. P. 263–267.
  24. Dowson C., O’Reilly S. DNA methylation in fibrosis // Eur. J. Cell. Biol. 2016. V.95. № 9. P. 323–330.
  25. Fernández P., Perez–Aso M., Smith G., Wilder T. Extracellular generation of adenosine by the ectonucleotidases CD39 and CD73 promotes dermal fibrosis // Am. J. Pathol. 2013. V. 183. № 6. P. 1740–1746.
  26. Friedkin M., Roberts D. The enzymatic synthesis of Nucleosides. I Thymidine Phosphorylase in mammalian tissue // J. Biol. Chem. 1954. V. 207. P. 245–255.
  27. Friedmann H.C., Vennesland B. Crystalline Dehydrorotic Dehydrogenase // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. № 5. P. 1526–1532.
  28. Furue M., Mitoma C., Mitoma H. et al. Pathogenesis of systemic sclerosis—current concept and emerging treatments // Immunol. Res. 2017. V. 65. № 4. P. 790–797.
  29. Gigante A., Barbano B., Barilaro G. et al. Serum uric acid as a marker of microvascular damage in systemic sclerosis patients // Microvascular Research. 2016. V. 106. P. 39–43.
  30. Gilbane A.J., Denton C.P., Holmes A.M. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells // Arthritis Res. Ther. 2013. V. 15. № 3. P. 215.
  31. Hayden M.R., Tyagi S.C. Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle // Nutr. Metab. (Lond.). 2004. V. 1. P. 10.
  32. Jordan S., Maurer B., Michel B., Distler O. Performance of the new EULAR/ACR classification criteria for systemic sclerosis in clinical practice // Ann. Rheum. Dis. 2013. V. 72. № 3. P. 60.
  33. Karson D.A., Wasson D.B., Lakow E., Kamatani N. Possible metabolic basis for the different immunodeficient states associated with genetic deficiencies of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase // Proc. Nat. Acad. Scien. USA. 1982. V. 79. № 12. P. 3848–3852.
  34. Koerner J.F. Enzymes of nucleic acid metabolism // Annu. Rev. Biochem. 1970. V. 39. P. 291–322.
  35. Makino T., Jinnin M.J. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis // Dermatol. 2016. V. 43. № 1. P. 10–18.
  36. Martinek R.G. Micromethod for estimation of serum adenosine deaminase // Clin. Chem. 1963. V. 9. № 5. P. 620–625.
  37. Mehra S., Walker J., Patterson K., Fritzler M.J. Autoantibodies in systemic sclerosis // Autoimmun Rev. 2013. V. 12. № 3. P. 340–354.
  38. Monn E., Christiansen R.O. Guanilate kinase in man – multiple molecular forms // Hum. Hered. 1972. V. 22. № 1. P. 18–27.
  39. North M.E., Newton C.A., Webster A.D. Phosphorylation of deoxyguanosine by B and T lymphocytes: evidence against selective trapping of deoxyguanosine by T lymphocytes in purine nucleoside phosphorylase deficiency // Clin. Exp. Immunol. 1980. V. 42. № 3. P. 523–529.
  40. Peng W.J., Yan J.W., Wan Y.N. et al. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis // J. Clin. Immunol. 2012. V. 32. № 6. P. 1409–1414.
  41. Pernis A.B., Ricker E., Weng C.H., Rojo C., Yi W. Rho Kinases in Autoimmune Diseases // Annu. Rev. Med. 2016. V. 67. P. 355–374.



42. Robertson B.C., Hoffee P.A. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Salmonella typhimurium* // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 6. P. 2040–2043.
43. Sacchetti C., Bottini N. Protein Tyrosine Phosphatases in Systemic Sclerosis: Potential Pathogenic Players and Therapeutic Targets // Curr. Rheumatol Rep. 2017. V. 19. № 5. P. 28.
44. Schelling P., Folkers G., Scapozza L. A spectrophotometric assay for quantitative determination of kcat of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase substrates // Anal. Biochem. 2001. V. 295. № 1. P. 82–87.
45. Sowers J.R. Diabetes and vascular disease // Hypertension. 2013. V. 61. P. 943–947.
46. Zhang L., Wan Y.N., Zhao J.H. et al. The association between systemic sclerosis, arginine and asymmetric dimethylarginine // Inflammation. 2015. V. 38. № 1. P. 218–223.
47. Wang T.P., Sable H.Z., Lampen J.O. Enzymatic deamination of cytosine nucleosides // J. Biol. Chem. 1950. V. 184. № 1. P. 17–28.

## Activity of Purine and Pyrimidine Metabolism Enzymes in Systemic Scleroderma: Enzymatic Patterns of Blood Plasma and Lysed Lymphocytes

I. A. Zborovskaya<sup>a, b</sup>, E. E. Mozgovaya<sup>a, #</sup>, A. S. Trofimenko<sup>a, b</sup>, and S. A. Bedina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology", 400138 Volgograd, Russia

<sup>b</sup>Volgograd State Medical University, 400131 Volgograd, Russia

<sup>#</sup>e-mail: nauka@pebma.ru

Received August 3, 2018; revised December 17, 2018; accepted February 2, 2019

Systemic scleroderma is a severe autoimmune injury of connective tissue, which is accompanied by diffuse microcirculatory impairment as well as skin and visceral fibrosis. Despite the fact that most of current researches are focused principally on immune disorders within the framework of scleroderma development, pathogenesis of this condition includes a wide variety of intracellular metabolic shifts. Both purine and pyrimidine metabolic pathways are diverse and multistage cascades of enzymatic reactions that lead to production of a broad array of regulatory and metabolically active substances. Imbalance of intracellular enzymatic activities involved in purine and pyrimidine metabolism is a distinctive feature of systemic scleroderma, it also intimately associated with disease activity and progression.

**Keywords:** adenosine deaminase, adenosine kinase, guanylate kinase, dihydroorotate dehydrogenase, IMP dehydrogenase, purine nucleoside phosphorylase, thymidine kinase, thymidine phosphorylase, uracil/thymidine dehydrogenase, cytidine deaminase, systemic scleroderma, lysed lymphocytes, blood plasma