УДК 616.72-002.77

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КСАНТИНОКСИДАЗА/КСАНТИНДЕГИДРОГЕНАЗА КРОВИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ

Мозговая Е.Э., Бедина С.А., Трофименко А.С., Зборовская И.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: ea.mozgovaya@gmail.com

Изучали изменение активности ксантиноксидазы (КО, ЕС 1.2.3.2) и ксантиндегидрогеназы (КДГ, ЕС 1.2.1.37) в плазме крови и лизатах лимфоцитов больных ревматоидным артритом (РА) при введении среднетерапевтических доз метилпреднизолона и бетаметазона. В исследовании участвовали 47 больных РА и 35 практически здоровых людей. Больные РА были разделены на 2 группы. В первой группе испытуемым внутримышечно вводился метилпреднизолон (метипред 3% 1,0 мл (30 мг)), во второй группе – бетаметазон, 7 мг (дипроспан 1,0 мл). В плазме крови больных РА после введения среднетерапевтических доз глюкокортикоидных препаратов, а также в лизатах лимфоцитов после введения метипреда отмечалось снижение активности КО и повышение активности КДГ, хотя нормальных значений изучаемые показатели не достигали. Переключение заключительного этапа пуринового метаболизма по пути утилизации гипоксантина и ксантина под воздействием КДГ ведет к снижению выработки активных форм кислорода (АФК). Можно предположить, что уменьшение продукции АФК наряду со свойственной глюкокортикоидам способностью к стабилизации лизосомальных и клеточных мембран также способствует сокращению образования «нейтрофильных внеклеточных ловушек».

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ксантиноксидазы, ксантиндегидрогеназы, глюкокортикоидные препараты

CHANGES OF XANTHINOXIDASE/XANTINDHYDROGENASE SYSTEM ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS AFTER THE INTRODUCTION OF GLUCOCORTICOSTEROIDS

Mozgovaya E.E., Bedina S.A., Trofimenko A.S., Zborovskaya I.A.

Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy», Volgograd, e-mail: ea.mozgovaya@gmail.com

The changes of xanthine oxidase (XO, EC 1.2.3.2) and xanthine dehydrogenase (XDG, EC 1.2.1.37) activity were studied in blood plasma and lysed lymphocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients after the introduction of the average therapeutic doses of methylprednisolone and betamethasone. 47 RA patients and 30 healthy controls were enrolled in the study. RA patients were divided into 2 groups. Methylprednisolone (metipred 3% 1.0 ml (30 mg)) in the first group and betamethasone, 7 mg (diprospan 1.0 ml) in the second group were administered intramuscularly. The decreased XO activity and increased XDG activity were observed in blood plasma of RA patients after administration of the average therapeutic doses of glucocorticosteroids, as well as in lysed lymphocytes after the administration of metipred. While enzymatic patterns did not reach the level of healthy controls. The switchover of the final stage of purine metabolism along the way of utilization of hypoxanthine and xanthine under the catalysis of XRG leads to decrease in the production of active forms of oxygen (AFO). It can be assumed that a decrease in the production of AFO along with the characteristic ability of glucocorticosteroids to stabilize lysosomal and cell membranes also helps to reduce the formation of «neutrophil extracellular traps».

Keywords: rheumatoid arthritis, xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase, glucocorticosteroids

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое прогрессирующее аутоиммунное воспалительное заболевание, характеризующееся деструктивными изменениями суставов с частым развитием системного поражения внутренних органов. Это одно из наиболее тяжелых иммуновоспалительных заболеваний человека.

Распространенность РА среди взрослого населения в разных географических зонах мира колеблется от 0,5 до 2% (у женщин 65 лет – около 5%). По данным Российского эпидемиологического исследования РА страдают около 800 тыс. человек, что соответствует распространенности РА в большинстве стран Европы [1].

Заболевание приводит к ранней инвалидизации (в половине случаев в течение первых 3–5 лет от его начала) и сокращению продолжительности жизни пациентов.

Определенные успехи терапии РА достигнуты в рамках стратегии «Лечение до достижения цели». При этом важную роль играют как можно более раннее начало терапии, ее подбор, основанный на оценке стандартизованных индексов активности заболевания в динамике; междисциплинарный подход, предусматривающий применение фармакологических и нефармакологических методов, при необходимости совместную работу специалистов многих медицинских специальностей. Во многих случаях удается добиться

стойкой ремиссии РА с сохранением трудоспособности и качества жизни пациентов. В то же время даже тщательный подбор терапии с использованием противоревматических препаратов, обладающих разными механизмами действия, включая генно-инженерные биологические препараты, базисные противовоспалительные препараты, не позволяет достигнуть полного излечения от недуга.

Согласно современным представлениям, этиология РА остается неизвестной. В качестве предрасполагающих рассматриваются факторы внешней среды, генетическая предрасположенность. Патогенез РА сложен, в его основе лежат глубокие нарушения иммунного ответа с дисбалансом количественного и качественного состава иммунокомпетентных клеток, с изменением их функциональной активности и клеточной кооперации.

Очевидно, что кардинальное улучшение прогноза при РА зависит не только от совершенствования стратегии фармакотерапии РА с использованием имеющихся в нашем арсенале средств, но также от разработки и внедрения новых инновационных лекарственных препаратов.

В связи с вышеизложенным сохраняют актуальность исследования, направленные на углубленное изучение патогенетических звеньев развития РА, поиск новых «мишеней» для терапевтического воздействия, изучение изменений, в том числе метаболического уровня, на фоне применения разных групп препаратов.

Цель исследования: изучить изменение активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы в плазме крови и лизатах лимфоцитов больных РА при введении среднетерапевтических доз метилпреднизолона и бетаметазона.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 47 больных РА и 35 практически здоровых людей. Статистически значимых различий между данными группами по полу-возрастному составу выявлено не было. Диагноз РА устанавливался на основании критериев ACR/EULAR (2010) [2]. Поскольку ранее нами была выявлена зависимость активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы от степени активности РА [3, 4], в целях исключения влияния данного фактора, в исследовании участвовали только больные со II степенью активности патологического процесса, верифицированной с использованием индекса DAS 28 [5].

Больные были разделены на две сопоставимые по полу, возрасту и клиническим проявлениям РА группы ($p < 0,05$).

Первую группу составили 25 больных РА: 8 (32%) мужчин и 17 (68%) женщин. Средний возраст испытуемых – $41,8 \pm 1,05$ лет, длительность болезни – $7,9 \pm 0,21$ лет. Серопозитивный по ревматоидному фактору (РФ) вариант отмечался у 19 (76%) больных. Системные поражения выявлены у 9 (36%) наблюде-

ниях. Первая рентгенологическая стадия поражения суставов по Штейнброкеру определялась у 2 (8,0%), II – у 16 (64,0%), III – у 7 (28,0%) больных.

Во вторую группу вошли 22 больных РА: 8 (36,4%) мужчин и 14 (63,6%) женщин. Средний возраст испытуемых составил $40,9 \pm 1,07$ лет, длительность болезни – $8,0 \pm 0,33$ года. Серопозитивный по РФ вариант диагностирован у 17 (77,3%) больных. Системные поражения выявлены в 8 (36,4%) случаях. У 2 (9,1%) больных определялась I, у 13 (59,1%) больных – II, у 7 (31,8%) больных – III стадия поражения суставов.

Больным первой группы однократно внутримышечно вводился метилпреднизолон (метипред 3% 1,0 мл (30 мг)), больным второй группы – бетаметазон, 7 мг (дипроспан 1,0 мл). Препараты вводились утром до приема пищи и иных плановых медикаментозных средств.

Забор крови (8–10 мл) для проведения ферментных исследований осуществлялся из локтевой вены до и через 30–35 минут после введения испытуемому лекарственного препарата. Больные в этот промежуток времени пищу и лекарственные препараты не принимали.

Активность ферментов исследовали в плазме и лизатах лимфоцитов периферической крови в день ее забора. Выделение лимфоцитов из венозной крови проводилось по методике А. Вёйта [6] 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.

Активность ксантиноксидазы (О-форма; ЕС 1.2.3.2) и ксантиндегидрогеназы (Д-форма; ЕС 1.2.1.37) определяли в лизатах лимфоцитов и плазме крови спектрофотометрическим методом по ранее описанным методикам: ксантиноксидазы [7]; ксантиндегидрогеназы [8]. Активность энзимов в лизатах лимфоцитов нормировали из расчета на содержание лимфоцитов до лизиса 1×10^7 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 ($M \pm \sigma$). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У больных РА обеих групп в сравнении со здоровыми лицами в плазме крови определялась более высокая активность ксантиноксидазы ($p < 0,001$) и более низкая активность ксантиндегидрогеназы ($p < 0,001$), в лизатах лимфоцитов более низкая активность обоих ферментов (табл. 1–2).

После введения метипреда в первой группе испытуемых в плазме крови наблюдали повышение активности ксантиндегидрогеназы ($p < 0,001$) на фоне снижения активности ксантиноксидазы ($p < 0,001$) (табл. 1), хотя по сравнению с группой здоровых лиц активность ксантиндегидрогеназы ($p < 0,001$) была по-прежнему ниже, а активность ксантиноксидазы ($p < 0,001$) – выше (табл. 1). Аналогичные результаты были получены во второй группе после введения дипроспана (табл. 2).

В лизатах лимфоцитов в первой группе после введения метипреда выявлено повышение активности ксантиндегидрогеназы ($p < 0,005$) и снижение активности ксантиноксидазы ($p < 0,01$) (табл. 1), в то время как наблюдавшееся во второй группе после введения дипроспана повышение активности ксантиндегидрогеназы и снижение активности ксантиноксидазы лизатов лимфоцитов было статистически недостоверным (табл. 2). В обеих группах после введения ГК в сравнении со здоровыми лицами сохранялись более низкие показатели активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы лизатов лимфоцитов (табл. 1–2).

Таким образом, в плазме крови больных РА после внутримышечного введения среднетерапевтических доз глюкокортикоидных препаратов (метипреда или дипроспана), а также в лизатах лимфоцитов после введения метипреда отмечалось достоверное снижение активности ксантиноксидазы и повышение активности ксантиндегидрогеназы, которое, однако, не позволяло изучаемым показателям достигнуть уровня нормальных значений. Тем не менее можно предположить, что на фоне введения глюкокортикоидов имело место переключение заключительного этапа пуринового метаболизма по пути утилизации гипоксантина и ксантина под воздействием ксантиндегидрогеназы. Выявленные изменения активности ферментов системы ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа носят позитивный характер, поскольку ведут к снижению выработки супероксидных радикалов, и, следовательно, способствуют повышению антиоксидантного потенциала больного РА.

В настоящее время важная роль в развитии и поддержании воспалительного процесса при РА отводится нейтрофильным

гранулоцитам, что обусловлено продукцией ими различных медиаторов воспаления (активные формы кислорода, интерлейкин-8, интерлейкин-12, серотонин, кинины, простагландины, лейкотриены и др.). Сведения об изменении функциональных свойств нейтрофильных гранулоцитов при РА достаточно противоречивы. Так, у пациентов с ранним РА описано увеличение кислород-продуцирующей и поглотительной активности нейтрофильных гранулоцитов [9]. В другой работе приводятся данные об уменьшении реактивности нейтрофильных гранулоцитов при данном заболевании [10].

Относительно недавно была открыта способность нейтрофильных гранулоцитов в ответ на действие эндогенных и экзогенных стимулов, в том числе интерлейкин-8, антител к цитруллинированным белкам (АЦБ), РФ, АЦБ/РФ-иммунных комплексов, активных форм кислорода, образовывать «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (neutrophil extracellular traps, NET). Они представляют собой сетеподобные структуры, состоящие из ДНК, гистонов, различных белков, ферментов гранул (эластаза, миелопероксидаза и др.), выбрасываемые нейтрофилами во внеклеточное пространство после фиксации нейтрофилов в тканях или на эндотелиоцитах [11]. Формирование NET является важным механизмом врожденного иммунного ответа. Первоначально данное проявление функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов рассматривалось лишь с позиций реализации внеклеточной бактерицидности. Однако на современном этапе изучения получены данные, свидетельствующие об участии компонентов NET в формировании аутоиммунного воспаления в роли факторов аутоагрессии [11–14].

Таблица 1

Активность ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы у больных РА до и после введения метипреда

Фермент	Больные РА		Здоровые	p, непарный критерий Стьюдента
	до введения метипреда	после введения метипреда		
ксантиноксидаза плазмы крови	$4,58 \pm 0,47^{1,2}$	$4,18 \pm 0,36^{2,3}$	$3,25 \pm 0,25^{1,3}$	$^1p < 0,001$ $^2p < 0,001$ $^3p < 0,001$
ксантиноксидаза лизатов лимфоцитов	$11,4 \pm 0,82^{1,2}$	$10,7 \pm 0,57^{2,3}$	$20,6 \pm 3,11^{1,3}$	$^1p < 0,001$ $^2p < 0,01$ $^3p < 0,001$
ксантиндегидрогеназа плазмы крови	$4,49 \pm 0,19^{1,2}$	$4,85 \pm 0,16^{2,3}$	$5,35 \pm 0,32^{1,3}$	$^1p < 0,001$ $^2p < 0,001$ $^3p < 0,001$
ксантиндегидрогеназа лизатов лимфоцитов	$14,4 \pm 1,52^{1,2}$	$15,3 \pm 1,43^{2,3}$	$30,7 \pm 3,84^{1,3}$	$^1p < 0,001$ $^2p < 0,005$ $^3p < 0,001$

Таблица 2

Активность ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы у больных РА
до и после введения дипроспана

Фермент	Больные РА		Здоровые	p, непарный критерий Стьюдента
	до введения дипроспана	после введения дипроспана		
ксантиноксидаза плазмы крови	4,74 ± 0,39 ^{1,2}	4,29 ± 0,32 ^{2,3}	3,25 ± 0,25 ^{1,3}	¹ p < 0,001 ² p < 0,001 ³ p < 0,001
ксантиноксидаза лизатов лимфоцитов	11,3 ± 0,77 ^{1,2}	10,9 ± 0,58 ^{2,3}	20,6 ± 3,11 ^{1,3}	¹ p < 0,001 ² p > 0,05 ³ p < 0,001
ксантиндегидрогеназа плазмы крови	4,41 ± 0,13 ^{1,2}	4,87 ± 0,11 ^{2,3}	5,35 ± 0,32 ^{1,3}	¹ p < 0,001 ² p < 0,001 ³ p < 0,001
ксантиндегидрогеназа лизатов лимфоцитов	14,6 ± 1,73 ^{1,2}	15,6 ± 1,65 ^{2,3}	30,7 ± 3,84 ^{1,3}	¹ p < 0,001 ² p > 0,05 ³ p < 0,001

Имеется ряд работ, подтверждающих взаимосвязь образования NET с прогрессированием и особенностями клинко-иммунологических проявлений у больных РА. У пациентов с РА повышена способность к формированию NET. При этом серопозитивный вариант РА характеризуется более высокой способностью нейтрофилов к образованию NET, чем серонегативный вариант. Обнаружена прямая взаимосвязь между концентрацией РФ и количеством нейтрофильных сетей [11, 15].

Как известно, для глюкокортикоидов характерен широкий спектр биологического действия. Однако в ревматологии в основном используют их противовоспалительные и иммунодепрессивные свойства. Полученные нами данные согласуются с общепринятыми представлениями об уменьшении образования свободных радикалов и вызываемых ими нарушений при применении этой группы препаратов.

Согласно результатам нашего исследования, введение глюкокортикоидов больным РА сопровождается снижением активности ксантиноксидазы, катаболизирующей пурины до мочевой кислоты и в сопряженной реакции восстанавливающей кислород до супероксида. Можно предположить, что происходящее в результате этого сокращение продукции активных форм кислорода наряду со свойственной глюкокортикоидам способностью к стабилизации лизосомальных и клеточных мембран также способствует сокращению образования NET.

Дальнейшее изучение процесса образования и состава NET при РА представляет интерес как с точки зрения уточнения неко-

торых звеньев патогенеза данного заболевания, так и с позиций изучения влияния на NETоз противоревматических препаратов с разными механизмами действия. Результаты исследований в этих направлениях могут иметь не только теоретическое значение, но также способствовать разработке новых групп препаратов для терапии РА, коррекции схем применения традиционно используемых лекарственных средств в целях улучшения прогноза при РА.

Выводы

1. Введение среднетерапевтических доз метилпреднизолона (метипред) и бетаметазона (дипроспан) сопровождается повышением активности ксантиндегидрогеназы, снижением активности ксантиноксидазы плазмы крови и лизатов лимфоцитов.

2. Уменьшение под воздействием глюкокортикоидов опосредованной ксантиноксидазой продукции активных форм кислорода может оказывать позитивное действие на течение аутоиммунного воспаления при РА.

Список литературы

1. Российские клинические рекомендации. Ревматология / под ред. Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 464 с.
2. Aletaha D., Neogri T., Silman A.J. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria. An American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism collaborative initiative // Arthritis Rheum. 2010. Vol. 62. P. 2569–2581.
3. Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите // Врач-аспирант. – 2011. – № 4 (47). – С.45–50.

4. Мозговая Е.Э., Романов А.И., Бедина С.А., Мартынянов В.Ф. Клинико-патогенетическое значение исследований активности аденозиндезаминазы, пуриноклеозидфосфорилазы, ксантиндегидрогеназы и их изоферментов в лизатах лимфоцитов и плазме крови больных ревматоидным артритом // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2013. – № 2. – С. 135–139.
5. Ревматология: Клинические рекомендации / под ред. акад. РАМН Е.Л. Насонова. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
6. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
7. Дячина Е.Г. Активность КО в сыворотке крови у больных с хирургическими заболеваниями печени, желчевыводящих путей и др. заболеваниями // Лаб. дело. – 1973. – № 11. – С. 647–649.
8. Devenyi Z.J., Orchard J.L., Powers R.E. Xanthine oxydase activity in mouse pancreas: effect of caerulein-induced acute pancreatitis // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 149. № 3. P. 841–843.
9. Siqueira M.B.P. et al. Enhanced phagocytosis and superoxide anion production by neutrophils in early rheumatoid arthritis patients related to positivity to anticyclic citrullinated peptides and rheumatoid factor // Ann Rheum Dis. 2012. № 71. Suppl. 3. P. 641.
10. Клеточные и гуморальные факторы рецидивирующего течения ревматоидного артрита / В.Н. Коваленко [и др.] // Украинский ревматологический журнал. – 2007. – № 1 (27). – С. 47–54.
11. Железко В.В., Новикова И.А. Функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с ревматоидным артритом // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 3. – С. 50–54.
12. Kaplan M.J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases // Arthritis Research & Therapy. 2013. Vol. 15. P. 219–228.
13. Khandpur R. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis // Sci. Transl. Med. 2013. Vol. 5. P. 178.
14. Wright H.L. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis // Nature Reviews Rheumatology [Electronic resource] – 2014. – Mode of access URL: <http://www.nature.com/nrrheum/journal/vaop/ncurrent/full/nrrheum.2014.80.html>. (date of access: 17.04.2018).
15. Wang W., Peng W., Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis // Int. J. Rheum Dis. 2018. Vol. 21(2). P. 415–421.