

## **ВЛИЯНИЕ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ КСАНТИНОКСИДОРЕДУКТАЗЫ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ**

**Мозговая Е.Э.<sup>1</sup>, Бедина С.А.<sup>1</sup>, Трофименко А.С.<sup>1</sup>, Мамус М.А.<sup>1</sup>, Тихомирова Е.А.<sup>1</sup>, Спицина С.С.<sup>1</sup>, Зборовская И.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: ea.mozgovaya@gmail.com

В крови больных ревматоидным артритом (РА) было изучено изменение активности двух форм ксантиноксидоредуктазы (КОР): ксантиндегидрогеназа (КДГ) и ксантинооксидаза (КО) – на фоне введения среднетерапевтических доз диклофенака натрия и кетопрофена. В исследование включены 46 больных с верифицированным диагнозом РА (ACR/EULAR 2010) и средней активностью болезни (DAS 28), которые были разделены на 2 подгруппы. Контрольная группа представлена 35 практически здоровыми людьми. Пациентам первой подгруппы внутримышечно вводили диклофенак натрия (диклофенак, Немофарм (75 мг)), второй подгруппы – кетопрофен (кетонал, Sandoz Novartis (100 мг)). В плазме крови, лизатах лимфоцитов и лизатах эритроцитов больных РА после введения нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) отмечалось снижение активности КО на фоне роста активности КДГ. Изменение под воздействием НПВП баланса оксидазной/дегидрогеназной активности КОР с биохимической точки зрения имеет позитивную направленность, поскольку способствует уменьшению выработки супероксидных радикалов. В то же время функционирование фермента, так же как и действие NADH-оксидазы и нитратредуктазы, вероятно, может способствовать хронизации и прогрессу патологического процесса при РА за счет генерации активных форм кислорода и азота.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ксантиноксидоредуктаза, ксантиндегидрогеназа, ксантинооксидаза, нестероидные противовоспалительные препараты.

## **EFFECT OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THE ACTIVITY OF XANTHINOXIDOREDUCTASE IN RHEUMATOID ARTHRITIS**

**Mozgovaya E.E.<sup>1</sup>, Bedina S.A.<sup>1</sup>, Trofimenko A.S.<sup>1</sup>, Mamus M.A.<sup>1</sup>, Tikhomirova E.A.<sup>1</sup>, Spitsina S.S.<sup>1</sup>, Zborovskaya I.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>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 two forms of xanthine oxidoreductase (XOR) (xanthine dehydrogenase (XDG) and xanthine oxidase (XO)) activities were investigated in blood of rheumatoid arthritis (RA) patients after the injection of the average therapeutic doses of diclofenac sodium and ketoprofen. The study included 46 patients with a verified diagnosis of RA (ACR/EULAR 2010) and average disease activity (DAS 28), who were divided into 2 subgroups. The control group consisted of 35 practically healthy people. Diclofenac sodium (diclofenac, Hemofarm (75 mg)) in the first subgroup and Ketoprofen (ketonal, Sandoz Novartis (100 mg)) in the second subgroup were administered intramuscularly. The decrease of XO activity against the background of increased XDG activity was observed in plasma, lysed lymphocytes and lysed red blood cells of RA patients after the injection of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). From a biochemical point of view, the change under the influence of NSAIDs in the balance of oxidase / dehydrogenase activity of XOR has a positive direction, since it helps to reduce the production of superoxide radicals. At the same time, the functioning of the enzyme as well as NADH oxidase and nitrate reductase can probably contribute to the chronicity and progression of the pathological process in RA due to the generation of reactive oxygen and nitrogen species.

Keywords: rheumatoid arthritis, xanthine oxidoreductase, xanthine dehydrogenase, xanthine oxidase, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Согласно современным представлениям ревматоидный артрит (РА) относится к тяжелым аутоиммунным ревматическим заболеваниям. Причины его неизвестны. Развитие хронического эрозивного артрита, часто сопровождающееся системным поражением внутренних органов, обуславливает сложности лечения больных, страдающих РА.

Агрессивное течение болезни ведет к ранней инвалидизации пациентов, снижению качества и продолжительности их жизни. Распространенность РА в России такая же, как в большинстве европейских стран: около 800 тыс. человек [1].

В основе патогенеза РА лежат глубокие иммунологические нарушения, проявляющиеся дисбалансом количественного и качественного состава Т- и В-лимфоцитов, изменением функциональной активности и кооперации иммунокомпетентных клеток, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов [2]. Наряду с этими изменениями в развитии заболевания важную роль играет активация процессов свободнорадикального окисления, вызывающих повреждение клеток на уровне мембран [3]. Одним из источников свободных радикалов является ксантиноксидоредуктаза (КОР), генерирующая в процессе своего функционирования активные формы кислорода (АФК), активные формы азота (АФА), оксид азота, ответственные за развитие многих патофизиологических реакций, а также имеющие важное физиологическое значение [4].

Исходя из ключевой роли воспаления, проявляющегося при РА как на местном, так и на системном уровнях, лечение заболевания основано на применении различных групп препаратов, действие которых направлено на его подавление.

Для снижения интенсивности боли, являющейся одним из основных признаков воспаления, при РА наиболее широко применяются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Препараты данной группы реализуют противовоспалительный и обезболивающий эффекты путем ингибирования циклооксигеназы, обеспечивающей синтез простагландинов [1, 5]. В то же время представляет интерес изучение изменений, происходящих на фоне их применения в других ферментных системах, в частности в системе КОР, повышенной экспрессии которой при РА способствуют фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерлейкин 6, играющие при данной патологии ключевую роль [6]. КОР обычно представлена во взаимопревращающихся формах: ксантиндегидрогеназа –  $\text{NAD}^+$ -зависимая D-форма (EC 1.17.1.4) и ксантиноксидаза –  $\text{NAD}^+$ -независимая O-форма (EC 1.17.3.2). При патологических состояниях фермент конвертируется преимущественно в оксидазную форму.

Цель исследования: получение представлений об изменениях активности оксидазной и дегидрогеназной форм ксантиноксидоредуктазы крови после введения среднетерапевтических доз диклофенака натрия и кетопрофена.

**Материал и методы исследования.** Исследование проведено с участием 46 больных с диагнозом РА, верифицированным в соответствии с классификационными критериями, разработанными экспертами American College of Rheumatology и European League Against Rheumatism в 2010 г. [7]. Контрольная группа, сравнимая по полу и возрасту с основной, была представлена 35 практически здоровыми людьми (24 (68,6%) женщины и 11 (31,4%)

мужчин), средний возраст в группе составил  $37,2 \pm 2,18$  года. В опубликованных ранее работах описана взаимосвязь активности энзимов пуринового метаболизма, в том числе ксантинооксидазы и ксантиндегидрогеназы, и активности РА [8]. Чтобы нивелировать влияние этого фактора, в настоящее исследование были отобраны больные, имеющие среднюю степень активности болезни ( $DAS28 = 3,2-5,1$ ). Больных разделили на две подгруппы, которые были сравнимы по демографическим признакам (полу и возрасту) и клиническим проявлениям (табл. 1).

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика подгрупп больных РА

Показатели		Первая подгруппа (N=30)	Вторая подгруппа (N=16)
Пол, N (%):	мужской	11 (36,7)	5 (31,3)
	женский	19 (63,3)	11 (68,7)
Средний возраст (лет), $M \pm \sigma$		$42,9 \pm 1,0$	$45,1 \pm 1,2$
Длительность болезни (лет), $M \pm \sigma$		$7,5 \pm 0,25$	$7,7 \pm 0,3$
Серопозитивность по РФ, N (%)		22 (73,3)	12 (75,0)
Наличие системных поражений, N(%)		11 (36,7)	5 (31,3)
Рентгенологическая стадия (по Штейнбрökerу), N (%):	I	2 (6,7)	1 (6,2)
	II	19 (63,3)	10 (62,5)
	III	9 (30,0)	5 (31,3)

У больных первой подгруппы в качестве НПВП однократно внутримышечно применяли диклофенак натрия (диклофенак, Nemofarm (75 мг)), во второй подгруппе – кетопрофен (кетонал, Sandoz Novartis) (100 мг). Кровь для определения активности энзимов забиралась из *v. ulnaris* дважды (до и через 30 минут после введения препаратов) и в тот же день подвергалась обработке с получением плазмы, лизатов лимфоцитов и лизатов эритроцитов, в которых определялась активность ксантинооксидазы и ксантиндегидрогеназы. Для выделения лимфоцитов и эритроцитов была применена методика А. Вöyum [9]. Градиент плотности  $1,077-1,079$  г/мл создавался с помощью препарата Lymphosep (MP Biomedicals LLC). Клетки крови лизировали при трехкратном замораживании-оттаивании с последующим центрифугированием. Во всех трех средах активность энзимов определялась спектрофотометрически и измерялась в нмоль/мин/мл [8].

Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с помощью программы STATISTICA 6. Значимость различий количественных данных оценивали с

помощью критерия Стьюдента. Результаты считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

Исследование соответствует этическим нормам (протокол от 30.10.2012 г. комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии» РАМН).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При изучении энзимных показателей в контрольной группе получены референтные интервалы, представленные в таблице 2.

Таблица 2

Референтные интервалы активности энзимов

Показатель	Референтные интервалы ( $M \pm 2\sigma$ ), нмоль/мин/мл		
	Плазма	Лизаты	
		Лимфоциты	Эритроциты
Активность ксантиноксидазы	2,75–3,75	14,38–26,82	18,88–25,72
Активность ксантиндегидрогеназы	4,71–5,99	23,02–38,38	44,08–53,72

Поскольку у практически здоровых лиц такие факторы, как пол и возраст, не оказывали влияния на уровень активности энзимов, они не учитывались при анализе данных, полученных в подгруппах больных РА.

В отличие от группы контроля у больных РА обеих подгрупп в плазме крови и лизатах эритроцитов определялась более высокая активность ксантиноксидазы ( $p < 0,001$ ) на фоне более низкой активности дегидрогеназной формы КОР ( $p < 0,001$ ). Для лизатов лимфоцитов было характерно снижение активности обеих форм энзима ( $p < 0,001$ ) (табл. 3, 4).

Таблица 3

Изменение активности энзимов в первой подгруппе больных РА

Энзим	Первая подгруппа больных РА		Контрольная группа	p, критерий Стьюдента
	До введения диклофенака натрия	После введения диклофенака натрия		
Ксантиноксидаза плазмы крови, ( $M \pm \sigma$ )	4,54±0,47 <sup>1,2</sup>	4,11±0,37 <sup>2,3</sup>	3,25±0,25 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> $p < 0,001$ <sup>2</sup> $p < 0,001$ <sup>3</sup> $p < 0,001$
Ксантиноксидаза лизатов лимфоцитов, ( $M \pm \sigma$ )	11,5±0,87 <sup>1,2</sup>	10,7±0,66 <sup>2,3</sup>	20,6±3,11 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> $p < 0,001$ <sup>2</sup> $p < 0,001$ <sup>3</sup> $p < 0,001$

Ксантинооксидаза лизатов эритроцитов, (M±σ)	26,3±1,35 <sup>1,2</sup>	25,8±2,79 <sup>2,3</sup>	22,3±1,71 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p>0,05 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа плазмы крови, (M±σ)	4,47±0,19 <sup>1,2</sup>	4,87±0,16 <sup>2,3</sup>	5,35±0,32 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,001 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа лизатов лимфоцитов, (M±σ)	14,3±1,63 <sup>1,2</sup>	15,3±1,63 <sup>2,3</sup>	30,7±3,84 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,05 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа лизатов эритроцитов, (M±σ)	38,1±1,19 <sup>1,2</sup>	38,7±6,43 <sup>2,3</sup>	48,9±2,41 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p>0,05 <sup>3</sup> p<0,001

Примечание: <sup>1</sup>p, <sup>3</sup>p – критерий Стьюдента для независимых выборок.

<sup>2</sup>p – критерий Стьюдента для зависимых выборок

Таблица 4

Изменение активности ферментов во второй подгруппе больных РА

Фермент	Вторая подгруппа больных РА		Контрольная группа	p, критерий Стьюдента
	До введения кетопрофена	После введения кетопрофена		
Ксантинооксидаза плазмы крови, (M±σ)	4,71±0,51 <sup>1,2</sup>	4,17±0,36 <sup>2,3</sup>	3,25±0,25 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,001 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантинооксидаза лизатов лимфоцитов, (M±σ)	11,4±0,88 <sup>1,2</sup>	10,6±0,76 <sup>2,3</sup>	20,6±3,11 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,01 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантинооксидаза лизатов эритроцитов, (M±σ)	26,3±1,4 <sup>1,2</sup>	24,9±1,08 <sup>2,3</sup>	22,3±1,71 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,01 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа плазмы крови, (M±σ)	4,47±0,16 <sup>1,2</sup>	4,88±0,12 <sup>2,3</sup>	5,35±0,32 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,001 <sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа лизатов лимфоцитов, (M±σ)	13,3±0,91 <sup>1,2</sup>	14,2±0,87 <sup>2,3</sup>	30,7±3,84 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,01

				<sup>3</sup> p<0,001
Ксантиндегидрогеназа лизатов эритроцитов, (M±σ)	38,8±0,88 <sup>1,2</sup>	40,6±0,68 <sup>2,3</sup>	48,9±2,41 <sup>1,3</sup>	<sup>1</sup> p<0,001 <sup>2</sup> p<0,001 <sup>3</sup> p<0,001

Примечание: <sup>1</sup>p, <sup>3</sup>p – критерий Стьюдента для независимых выборок.

<sup>2</sup>p – критерий Стьюдента для зависимых выборок

После введения диклофенака натрия в плазме крови больных первой подгруппы отмечали снижение активности ксантиноксидазы ( $p<0,001$ ) на фоне повышения активности ксантиндегидрогеназы ( $p<0,001$ ) (табл. 3). В то же время показатели активности ксантиноксидазы были по-прежнему выше, а ксантиндегидрогеназы – ниже в сравнении с контрольной группой ( $p<0,001$ ) (табл. 3). Подобные изменения претерпевали активности энзимов во второй группе после введения кетопрофена (табл. 4).

В лизатах лимфоцитов в первой подгруппе после введения диклофенака натрия наблюдали снижение активности ксантиноксидазы ( $p<0,001$ ) и повышение активности ксантиндегидрогеназы ( $p<0,05$ ) (табл. 3). Изменения активности энзимов во второй подгруппе после введения кетопрофена имели ту же направленность: снижение активности ксантиноксидазы ( $p<0,01$ ) при повышении активности ксантиндегидрогеназы ( $p<0,01$ ) (табл. 4). В обеих подгруппах после введения НПВП сохранялись более низкие, чем у здоровых лиц, показатели активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы лизатов лимфоцитов (табл. 3, 4).

В лизатах эритроцитов второй группы пациентов, которым вводили кетопрофен, было выявлено снижение активности ксантиноксидазы ( $p<0,01$ ) (табл. 3) на фоне повышения активности ксантиндегидрогеназы ( $p<0,001$ ), в то время как наблюдавшиеся в первой группе после введения диклофенака натрия снижение активности ксантиноксидазы и повышение активности ксантиндегидрогеназы лизатов эритроцитов были статистически недостоверны (табл. 2). В обеих группах после введения НПВП в сравнении со здоровыми лицами сохранялись более высокие показатели активности ксантиноксидазы и более низкие показатели активности ксантиндегидрогеназы лизатов эритроцитов (табл. 2, 3).

Таким образом, после внутримышечного введения среднетерапевтических доз как диклофенака натрия, так и кетопрофена в плазме крови, лизатах лимфоцитов и лизатах эритроцитов происходило снижение активности ксантиноксидазы на фоне роста активности ксантиндегидрогеназы. Изменения были статистически достоверными, за исключением динамики активности ферментов в лизатах эритроцитов при применении диклофенака натрия, хотя и в этом случае сохранялась общая тенденция.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что включенные в исследование НПВП могут оказывать влияние на ферментную систему КОР. При этом заключительные этапы катаболизма пуринов осуществляются при преимущественном каталитическом участии ксантиндегидрогеназы. Изменения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы носят позитивный характер, поскольку снижение активности оксидазной формы КОР ведет к уменьшению выработки супероксидных радикалов, образующихся в ходе катализируемой ею реакции. Однако в условиях низкого pH и гипоксии, характерных для воспаленных суставов [10], обе формы КОР могут проявлять NADH-оксидазную активность (ксантиноксидаза – в меньшей степени, NADH-оксидазная активность дегидрогеназной формы может достигать 40% от собственно ксантиндегидрогеназной), в результате чего образуются супероксид и перекись водорода [11]. Помимо этого, в таких условиях уменьшается сродство КОР к ксантину и в то же время увеличивается – к нитритам и нитратам, что ведет к генерации активных форм азота, в том числе высокореакционного пероксинитрита. Образующиеся в результате активности КОР АФК и АФА способны усиливать костную резорбцию и поддерживать прогрессирование заболевания. Можно предположить, что данные метаболические изменения могут служить одной из причин того, что, несмотря на противовоспалительную активность, НПВП не влияют на прогрессирование деструкции суставов при РА [1, 5].

Поскольку образующиеся при участии КОР свободные радикалы не только ответственны за реализацию патофизиологических реакций, но также обеспечивают целый ряд физиологических процессов, ингибирование фермента может иметь неблагоприятные последствия, уменьшая дифференцировку клеток, способствуя эпителиально-мезенхимальному переходу, ангиогенезу, процессу метастазирования [12]. В связи с этим в настоящее время актуален поиск субстанций, способных избирательно блокировать ее патологические эффекты.

**Заключение.** Введение среднетерапевтических доз диклофенака натрия и кетопрофена ведет к однонаправленным изменениям как в плазме крови, так и в лизатах лимфоцитов и эритроцитов: повышению активности ксантиндегидрогеназы и снижению активности ксантиноксидазы. Изменение под воздействием НПВП баланса оксидазной/дегидрогеназной активности КОР с биохимической точки зрения имеет позитивную направленность, однако функционирование фермента, так же как и действие NADH-оксидазы и нитратредуктазы, вероятно, может способствовать хронизации и прогрессу патологического процесса при РА.

## Список литературы

1. Российские клинические рекомендации. Ревматология / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с.
2. Бестаев Д.В., Каратеев Д.Е., Насонов Е.Л. Системные проявления ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. 2013. № 1. С.76-80.
3. Mateen S., Moin S., Khan A.Q., Zafar A., Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE. 2016. vol. 11. no. 4. e0152925. DOI: 10.1371/journal.pone.0152925.
4. Çimen M.Y., Çimen Ö.B., Kaçmaz M., Öztürk H.S., Yorgancıoğlu R., Durak İ. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. Clin. Rheumatol. 2000. vol. 19. no. 4. P. 275-277. DOI: 10.1007/s00296-010-1611-2.
5. Олюнин Ю.А. Ревматоидный артрит. Основной симптом и симптоматическая терапия // Современная ревматология. 2014. № 4. С.54-59.
6. 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. no 9. P. 1502-1517. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.022.
7. Aletaha D., Neogri T., Silman A.J. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria. An American College of Rheumatology. European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010. vol. 62. P. 2569-2581. DOI: 10.1002/art.27584.
8. Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите // Врач-аспирант. 2011. № 4. С.45-50.
9. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. А. И. Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. Т.2. С. 274-314.
10. Fearon U., Canavan M., Biniecka M. et al. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2016. vol. 12. P. 385–397. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.69.
11. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
12. Battelli M.G., Bortolotti M., Polito L., Bolognesi A. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. Redox Biology. 2019. vol. 21. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101070.