

## КСАНТИНОКСИДОРЕДУКТАЗА: АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЛИМФОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.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 представлен ферментный профиль ксантиноксидоредуктазы (КОР) плазмы крови и лизатов лимфоцитов у больных ревматоидным артритом (РА) в зависимости от рентгенологической стадии (РС) и функционального класса (ФК). В исследование включены 35 практически здоровых лиц и 77 больных РА. Диагноз РА установлен в соответствии с критериями ACR/EULAR 2010. Лимфоциты выделяли методом А. Вёйум в градиенте плотности 1,077–1,079 г/мл. Активность ксантиноксидазы (КО) и ксантиндегидрогеназы (КДГ) определяли методом спектрофотометрии. Референтный диапазон для КО – 2,29–4,31 нмоль/мин/мл и 14,11–31,33 нмоль/мин/мл; для КДГ – 4,52–5,97 нмоль/мин/мл и 18,62–39,64 нмоль/мин/мл в плазме и лимфоцитах соответственно. В исследуемых биологических средах выявлено изменение ферментного профиля КОР, демонстрирующее отчетливую зависимость показателей активности КО и КДГ от ФК и в меньшей степени – от РС поражения суставов. Уровень активности КО в плазме выше 4,78 нмоль/мин/мл, и/или активности КО в лимфоцитах ниже 14,3 нмоль/мин/мл, и/или активности КДГ в лимфоцитах ниже 18,13 нмоль/мин/мл может свидетельствовать о появлении деструктивных процессов в пораженных суставах и необходимости корректировки лечения.

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

## XANTHINOXIDOREDUCTASE: BLOOD PLASMA AND LYMPHOCYTES ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsina S.S., Mamus M.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 blood plasma and lymphocyte lysates in patients with rheumatoid arthritis (RA), depending on the X-ray stage (RS) and functional class (FC). 35 normal control persons and 77 RA patients as well as were included in the study. Diagnosis of RA had been established using ACR/EULAR 2010 criteria. Lymphocytes were isolated by A. Böyum's method in a density gradient of 1.077–1.079 g/ml. Xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH) activities were determined by spectrophotometrically. The reference ranges for XO were 2.29–4.31 nmol/min/ml and 14.11–31.33 nmol/min/ml; for XDH were 4.52–5.97 and 18.62–39.64 nmol/min/ml in plasma and lymphocytes, respectively. Enzyme profile of both biological media depended more on the functional class and, to a lesser extent, on the stage of X-ray destruction. Plasma XO activity above 4.78 nmol/min/ml, and/or lymphocytic XO activity below 14.3 nmol/min/ml, and/or lymphocytic XDH activity 18.13 nmol/min/ml articular destruction and the need to adjust treatment can predict.

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

Ревматоидный артрит (РА) – распространенное аутоиммунное заболевание соединительной ткани неизвестной этиологии, характеризующееся стойким синовиальным воспалением и разрушением суставов, которым страдает примерно 1% населения мира, при этом около 50% больных теряют трудоспособность в течение 10 лет после начала заболевания [1]. Хотя патогенез его до конца не изучен, очевидно, что болезнь поражает синовиальные суставы и проявляется такими клиническими симптомами, как боль, припухлость, скованность в суставах, сопровождающимися нарушением их функции. Довольно рано у

больных РА возникает нарушение структуры суставов. Уже в течение первых двух лет от начала заболевания регистрируются рентгенологические признаки деструкции пораженных суставов: субхондральный остеопороз, единичные костные эрозии. В дальнейшем хронический воспалительный процесс в суставах приводит к прогрессирующему разрушению суставов, их деформации, функциональным нарушениям, анкилозированию и в конечном итоге – к стойкой инвалидности и ухудшению качества жизни [1, 2].

Установлено, что в основе патогенеза РА лежит нарушение иммунорегуляторных процессов, зона ответственности которых распространяется на развитие реакций клеточного и гуморального иммунитета. В результате сбоя этих механизмов развивается хроническое воспаление с поражением в первую очередь суставов, а также различных систем внутренних органов [3]. При этом существенная роль в деструкции хрящевой и субхондральной костной ткани воспаленных суставов с развитием эрозивного артрита отводится паннусу, который представляет собой пролиферирующий синовиальный [1, 2]. Воспалительная реакция в синовиальной оболочке приводит к притоку периферических иммунокомпетентных клеток: лимфоцитов, нейтрофилов, макрофагов, а также к активации местных клеток. Высвобождаемые ими хемокины и особенно цитокины играют ключевую роль в хронизации воспаления. Клеточные и иммунологические процессы при РА тесно взаимосвязаны [4]. Таким образом, в прогрессирующей деструкции суставов ключевая роль принадлежит нарушениям в системе клеточного и гуморального иммунитета, запускающим глубокие механизмы, способствующие инициации воспаления и его хронизации уже на ранних стадиях заболевания. В то же время в патогенезе РА не менее важное значение отводится окислительному стрессу (ОС), развивающемуся в результате изменения баланса между прооксидантной и антиоксидантной системами организма. Избыточная генерация свободных радикалов и снижение нейтрализующей способности организма сопровождаются повреждением клеточных мембран и внутриклеточных структур белков и липидов [5]. Ферментный комплекс ксантиноксидоредуктаза (КОР), образованный дегидрогеназной и оксидазной формами: ксантиндегидрогеназой (КДГ) и ксантиноксидазой (КО) соответственно, является одним из источников активных форм кислорода (АФК), образующихся в ходе реакций, катализируемых этим ферментом [6].

За последние два десятилетия благодаря новым стратегиям ведения РА, появлению новых биологических методов лечения и более эффективному использованию традиционных модифицирующих противоревматических препаратов было достигнуто значительное улучшение прогноза заболевания. Однако стремительное прогрессирование деструктивных процессов в суставах и их запоздалое обнаружение часто приводят к необратимому разрушению суставов и глубокой инвалидности. В связи с этим своевременная диагностика

РА, выявление ранних структурных изменений и соответствующая терапия на ранних этапах заболевания признаны важными факторами, влияющими на улучшение отдаленных клинических исходов [2].

Цель исследования – описание профиля КОР в плазме и лимфоцитах у больных РА в зависимости от рентгенологической стадии (РС) и функционального класса (ФК).

### **Материал и методы исследования**

В исследование включены 112 человек: 77 (20 мужчин и 57 женщин) больных ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда с верифицированным диагнозом РА в соответствии с критериями ACR/EULAR (2010 г.) и 35 (16 мужчин и 19 женщин) практически здоровых людей – доноров станции переливания крови. Больные РА составили основную группу, практически здоровые доноры – референтную (контрольную) группу. Средний возраст (Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>]) контрольной группы – 39 [34; 46] лет, основной – 45 [37; 49] лет. Уровень активности РА оценивался по индексу DAS28. По полу и возрасту контрольная группа была сопоставима с основной.

Для исследования использовали плазму и периферические лимфоциты венозной крови. Лимфоциты выделяли методом А. Вёуит в градиенте плотности 1,077–1,079 г/мл с использованием лимфосепа («JCN Biomedicals») [7]. Определение жизнеспособности клеток и их подсчет проводили в камере Горяева микроскопическим методом с предварительным окрашиванием суспензии лимфоцитов в 0,2%-ном растворе трипанового синего. Окрашенные клетки из подсчета исключали, поскольку они признавались нежизнеспособными. На следующем этапе лимфоциты лизировали в 1%-ном растворе тритона X-100 с последующим трехкратным замораживанием – оттаиванием суспензии клеток и центрифугированием. Определение активности ферментов проводили спектрофотометрически с длиной волны для КО – 293 нм, а для КДГ – 340 нм и выражали в нмоль/мин/мл, для лимфоцитов – в пересчете на 10<sup>7</sup> клеток в 1 мл [7].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0. Для сравнения групп использовали U test Mann–Whitney. Данные, полученные в результате статистического анализа, представляли в виде: Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>], где Me – медиана, Q<sub>25</sub> и Q<sub>75</sub> – 25-й и 75-й процентиля соответственно. Частоту встречаемости признака выражали в процентах. Для анализа статистических связей признаков проводили корреляционный анализ по Спирмену. Достоверными различия считались при p<0,05.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Клиническая характеристика больных РА представлена в таблице 1. Группу больных РА в основном составили пациенты со 2-й степенью активности (63%) и без системных (внесуставных) проявлений (66%). Среди больных РА преобладали пациенты с II–III стадией

поражения суставов и II–III ФК. Существенной зависимости между стадией поражения суставов и степенью активности РА нами не обнаружено. Однако с увеличением продолжительности болезни определялась явная тенденция к прогрессированию поражения суставов: I–II РС наблюдалась при длительности РА до 5 лет, при продолжительности болезни 6–10 лет преимущественно (в 87,8% случаев) развивалась II–III, а при длительности болезни свыше 11 лет – III–IV стадии (62,3%). Увеличение активности ревматоидного процесса сопровождалось прогрессированием потери функциональных возможностей суставов. В то же время у 2 больных с минимальной активностью РА наблюдался ФК IV. В данных случаях одновременно диагностировалась и III–IV РС поражения суставов. Мы обнаружили четкую тенденцию параллельного увеличения РС поражения суставов и ФК ( $r=0,77$ ;  $p<0,001$ ). Однако в единичных случаях наблюдали существенное нарушение функции суставов при минимальной РС, сопровождающееся высокой активностью РА.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных РА

Оцениваемый показатель	Больные РА
Средняя продолжительность болезни, Me [Q <sub>25</sub> ; Q <sub>75</sub> ], лет	8 [6; 10]
Активность по DAS 28: 1/2/3, n (%)	16 (21)/49 (63)/12 (16)
Наличие системных проявлений: есть/нет, n (%)	26 (34)/51 (66)
Рентгенологическая стадия (по Штейнброкеру): I/II/III/IV, n (%):	7 (9)/40 (52)/24 (31)/6 (8)
Функциональный класс: II/III/IV, n (%)	33 (43)/38 (49)/6 (8)
Серопозитивность по РФ: есть/нет, n (%)	59 (77)/18 (23)
Серопозитивность по АЦЦП: есть/нет, n (%)	69 (90)/8 (10)

В референтной группе в обеих биологических средах зависимость активности ферментов от пола и возраста не выявлена, и данные параметры не принимались во внимание при изучении показателей активности ферментов в основной группе. 95-перцентильный интервал для КО – 2,29–4,31 нмоль/мин/мл и 14,11–31,33 нмоль/мин/мл; для КДГ – 4,52–5,97 нмоль/мин/мл и 18,62–39,64 нмоль/мин/мл в плазме и лимфоцитах соответственно. У больных РА в целом по группе по сравнению со здоровыми людьми активность КО увеличивалась в плазме и снижалась в лимфоцитах, в то время как активность КДГ снижалась и в плазме, и в лимфоцитах (табл. 2).

Таблица 2

Активность ферментов плазмы крови и лимфоцитов больных РА в зависимости от рентгенологической стадии и функционального класса (Me[Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>])

Группа	Плазма		Лимфоциты	
	КО	КДГ	КО	КДГ
Здоровые, n=35	3,28 [3,05; 3,38] <sup>1</sup>	5,30 [4,83; 5,41] <sup>2</sup>	20,94 [18,68; 22,67] <sup>3</sup>	29,76 [26,56; 33,70] <sup>4</sup>
РА (группа в целом), n=75	5,50 [4,91; 6,10] <sup>1</sup>	4,88 [4,43; 5,31] <sup>2</sup>	11,70 [9,99; 12,90] <sup>3</sup>	15,21 [12,85; 17,86] <sup>4</sup>
	p <sup>1</sup> <0,001	p <sup>2</sup> =0,059	<sup>3</sup> p<0,001	<sup>4</sup> p<0,001
Стадия I, n=7	4,93 [3,90; 5,57] <sup>5,9,13</sup>	4,24 [3,88; 4,76] <sup>6,10,14</sup>	13,92 [10,51; 15,70] <sup>7,11,15</sup>	19,30 [11,88; 22,37] <sup>8,12,16</sup>
Стадия II, n=39	5,47 [4,92; 6,14] <sup>5,17,21</sup>	5,12 [4,48; 5,34] <sup>6,18,22</sup>	11,16 [9,17; 12,65] <sup>7,19,23</sup>	15,14 [13,57; 16,27] <sup>8,20,24</sup>
Стадия III, n=24	5,91 [5,45; 6,21] <sup>9,17,25</sup>	4,67 [4,37; 4,86] <sup>10,18,26</sup>	10,70 [9,27; 11,68] <sup>11,19,27</sup>	13,95 [12,19; 15,58] <sup>12,20,28</sup>
Стадия IV, n=7	5,35 [4,93; 5,69] <sup>13,21,25</sup>	5,25 [4,66; 5,82] <sup>14,22,26</sup>	12,07 [11,15; 13,02] <sup>15,23,27</sup>	15,49 [15,04; 17,78] <sup>16,24,28</sup>
	<sup>5</sup> p=0,043 <sup>9</sup> p=0,012 <sup>13</sup> p=0,259 <sup>17</sup> p=0,078 <sup>21</sup> p=0,078 <sup>25</sup> p=0,012	<sup>6</sup> p=0,025 <sup>10</sup> p=0,139 <sup>14</sup> p=0,026 <sup>18</sup> p=0,083 <sup>22</sup> p=0,320 <sup>26</sup> p=0,128	<sup>7</sup> p=0,113 <sup>11</sup> p=0,038 <sup>15</sup> p=0,535 <sup>19</sup> p=0,372 <sup>23</sup> p=0,227 <sup>27</sup> p=0,043	<sup>8</sup> p=0,113 <sup>12</sup> p=0,061 <sup>16</sup> p=0,318 <sup>20</sup> p=0,071 <sup>24</sup> p=0,306 <sup>28</sup> p=0,017
ФК II, n=30	5,17 [4,78; 5,52] <sup>29,33</sup>	4,67 [4,21; 5,23] <sup>30,34</sup>	13,16 [11,49; 14,30] <sup>31,35</sup>	16,51 [14,56; 18,13] <sup>32,36</sup>
ФК III, n=40	6,14 [5,73; 6,50] <sup>29,37</sup>	5,02 [4,65; 5,54] <sup>30,38</sup>	10,31 [8,65; 10,99] <sup>31,39</sup>	15,27 [12,71; 16,42] <sup>32,40</sup>
ФК IV, n=7	6,46 [6,03; 7,75] <sup>33,37</sup>	5,00 [4,62; 5,21] <sup>34,38</sup>	8,22 [5,57; 9,66] <sup>35,39</sup>	10,34 [9,94; 12,95] <sup>36,40</sup>

	<sup>29</sup> p<0,001	<sup>30</sup> p=0,053	<sup>31</sup> p<0,001	<sup>32</sup> p=0,002
	<sup>33</sup> p=0,0001	<sup>34</sup> p=0,312	<sup>35</sup> p=0,0003	<sup>36</sup> p=0,00003
	<sup>37</sup> p=0,118	<sup>38</sup> p=0,803	<sup>39</sup> p=0,045	<sup>40</sup> p=0,001

Корреляционный анализ Спирмена выявил зависимость между активностью ферментов и ФК у больных РА (табл. 3). В лимфатах лимфоцитов эта зависимость носила обратный характер: чем выше ФК, тем ниже активность КО и КДГ; в плазме прогрессирование ФК сопровождалось увеличением активности КО (табл. 2). К тому же в лимфоцитах достоверные энзимные различия обнаружены между всеми ФК.

Таблица 3

Взаимосвязь между РС, ФК и активностью ферментов у больных РА

	Плазма		Лимфоциты	
	КО	КДГ	КО	КДГ
Рентгенологическая стадия	0,09 p=0,449	0,09 p=0,456	-0,099 p=0,393	-0,161 p=0,161
Функциональный класс	0,66 p<0,001	0,21 p=0,070	-0,639 p<0,001	-0,501 p<0,001

В то же время между РС и активностью КО и КДГ как в плазме, так и в лимфоцитах достоверной взаимосвязи не обнаружено (табл. 3). Несмотря на то что между всеми РС достоверных ферментных различий практически нет, прослеживается отчетливая тенденция: повышение активности ферментов в плазме и снижение – в лимфоцитах по мере роста стадии поражения суставов (табл. 2). Так, активность КО в плазме больных РА с I стадией ниже по сравнению с больными РА со II и с III РС; активность КДГ при I стадии ниже, чем при II. В лимфоцитах активность КО выше при I РС по сравнению с III.

Таким образом, проведенные нами исследования продемонстрировали отчетливую зависимость показателей активности КО и КДГ от ФК и в меньшей степени – от РС поражения суставов. Наличие деструктивных процессов в суставах и их прогрессирование является одной из основных характеристик РА. Возникает деструкция суставов вследствие хронического прогрессирующего воспалительного процесса в синовиальной ткани сустава и разрастания соединительной ткани с образованием паннуса, она проявляется разрушением хряща и костных структур с образованием единичных или множественных эрозий на суставных поверхностях с последующим анкилозированием суставов. В то же время при раннем РА в становлении функциональных ограничений суставов большое значение принадлежит активности заболевания, структурные изменения (деградация хряща и деструкция

субхондральной кости) являются ключевыми факторами в формировании стойких функциональных нарушений при развернутой стадии РА. При этом ведущая роль в необратимой потере функции суставов отводится деградации хряща [8].

Кроме того, в исследованиях зарубежных авторов было показано, что прогрессирование деструктивных рентгенологических изменений и функциональных нарушений суставов сопровождается усилением корреляционной взаимосвязи между ними. Эта связь становится достоверной в случае, если деструкция суставов достигает 1/3 от возможного максимума. Кроме того, с увеличением длительности заболевания растет и сила корреляции [9]. В своем исследовании мы также обнаружили зависимость высокой силы между РС поражения суставов и ФК. Для больных РА разрушение суставов представляет собой серьезную проблему, поскольку процесс повреждения суставов часто начинается еще до появления клинических симптомов заболевания, является прогрессирующим и нередко необратимым. Поэтому важно выявлять пациентов, предрасположенных к разрушению суставов, чтобы как можно скорее начать адекватное лечение и тем самым потенциально предотвратить необратимую деструкцию суставов [9]. Многочисленные опубликованные данные демонстрируют, что предупреждение деструктивных повреждений на ранних стадиях заболевания содействует сохранению функциональной активности пациентов и улучшению отдаленных клинических исходов [8].

### **Заключение**

В развитии и прогрессировании РА важная роль принадлежит ОС и процессам, которые он запускает в организме [10]. Значительный рост активности КО в плазме крови свидетельствует об участии ферментного комплекса КОР в реализации ОС у больных РА. Вместе с тем снижение активности КО и КДГ в лимфоцитах, несмотря на данные литературы [11], демонстрирующие наличие в них ОС, говорит о том, что свободно-радикальные механизмы в лимфоцитах протекают без существенного участия КОР. Генерация АФК в результате запуска ОС, по-видимому, инициирует метаболические нарушения, сопровождающиеся повреждением и гибелью клеток, формированием нейтрофилами и моноцитами внеклеточных ловушек, что запускает и поддерживает хронический воспалительный процесс, способствует разрушению хрящевого и костного вещества местными тканевыми клетками, синовиальными фибробластами и остеокластами и приводит к развитию стойкой деструкции суставов. При отсутствии лечения местные воспалительные и деструктивные процессы, а также системные воспалительные факторы вызывают прогрессирующее и необратимое разрушение суставов [4]. Уровень активности КО в плазме выше 4,78 нмоль/мин/мл, и/или активности КО в лимфоцитах ниже 14,3 нмоль/мин/мл, и/или активности КДГ в лимфоцитах ниже 18,13 нмоль/мин/мл может свидетельствовать о

появлении деструктивных процессов в пораженных суставах и необходимости коррекции терапии. Таким образом, ориентируясь на показатели активности ферментов КОР в плазме и лимфоцитах крови, можно прогнозировать развитие стойких функциональных нарушений у больных РА и корректировать проводимое лечение с целью предотвращения развития необратимой деструкции суставов.

### Список литературы

1. Meng X.H., Wang Z., Zhang X.N., Xu J., Hu Y.C. Rheumatoid Arthritis of Knee Joints: MRI-Pathological Correlation. *Orthop Surg.* 2018. Vol. 10 (3). P. 247-254. DOI: 10.1111/os.12389.
2. Sudoł-Szopińska I., Jans L., Teh J. Rheumatoid arthritis: what do MRI and ultrasound show. *J. Ultrason.* 2017. Vol. 17 (68). P. 5-16. DOI: 10.15557/JoU.2017.0001.
3. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016. Vol. 388 (10055). P. 2023-2038. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
4. Neumann E., Frommer K., Diller M., Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis. *Z. Rheumatol.* 2018. Vol. 77 (9). P. 769-775. DOI: 10.1007/s00393-018-0500-z.
5. 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 (4). P. e0152925. DOI: 10.1371/journal.pone.0152925.
6. Battelli M.G., Polito L., Bortolotti M., Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016. P. 3527579. DOI: 10.1155/2016/3527579.
7. 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.
8. Чичасова Н.В. Деструкция хряща при ревматоидном артрите, связь с функциональными нарушениями // *Современная ревматология.* 2014. № 4. С. 60–71. DOI: 10.14412/2074-2711-2014-4-60-71.
9. Bombardier C., Barbieri M., Parthan A., Zack D.J., Walker V., Macarios D., Smolen J.S. The relationship between joint damage and functional disability in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012. Vol. 71. P. 836-844. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200343.
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.

11. Bala A., Mondal C., Haldar P.K., Khandelwal B. Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants. *Inflammopharmacology*. 2017. Vol. 25 (6). P. 595-607. DOI: 10.1007/s10787-017-0397-1.