

УДК 616-002.77

ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ

Мартемьянов В.Ф., Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Зборовская И.А.

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

В лизатах лимфоцитов больных анкилозирующим спондилоартритом (АС) в процессе лечения проведены исследования активности аденозиндезаминазы (АДА), АМФ-дезаминазы (АМФДА), адениндезаминазы (АД), гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуридиннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ). Изучена зависимость активности ферментов от клинических особенностей заболевания. Показано, что у больных АС в лимфоцитах повышена активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ и снижена активность АДА и ГФ. Чем выше степень активности патологического процесса, острее течение и больше стадия поражения суставов и позвоночника, тем в лимфоцитах ниже активность АДА, ПНФ, ГФ и выше активность АМФДА, АД, ГЗДА. Исследование активности ферментов в лимфоцитах больных АС в процессе лечения способствует объективизации оценки эффективности назначенной терапии.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилит, аденозиндезаминаза, АМФ-дезаминаза, адениндезаминаза, гуаниндезаминаза, гуанозиндезаминаза, гуанозинфосфорилаза, пуридиннуклеозидфосфорилаза, пуриновый метаболизм

THE IMPORTANCE OF RESEARCH ACTIVITY OF THE ENZYME PURINE METABOLISM IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Martemyanov V.F., Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Zborovskaya I.A.

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

In lysates of lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis (AS) in the treatment studied the activity of adenosine deaminase (ADA), AMP-deaminase (AMFDA), adenine deaminase (AD), guanine deaminase (GDA), guanosine deaminase (GSDA), purine nucleoside phosphorylase (PNP) and guanosine phosphorylase (GP). The dependence of enzyme activity on the clinical features of the disease. It is shown that in patients with AS in lymphocytes increased activity of AMPDA, AD, GDA, GSDA, PNP and reduced activity of ADA and GP. The increase of the pathological process activity, during the acute stage and more destruction of the joints and spine was accompanied by the decrease increase of ADA, PNP, GP activities and the increase of AMFDA, AD, GSDA activities. The study of enzyme activity in lymphocytes of patients with AS during treatment contributes to facilitate the evaluation of the prescribed therapy.

Key words: ankylosing spondylitis, Adenosine deaminase, AMP-deaminase, adenine deaminase, Guanine deaminase, Guanosine deaminase, Guanosine phosphorylase, Purine nucleoside phosphorylase, purine metabolism

Медико-социальная значимость борьбы с анкилозирующим спондилоартритом (АС) обусловлена его достаточной высокой распространенностью (от 0,5% до 2%), заболеваемостью в социально активном возрасте, неуклонным прогрессирующим заболеванием с анкилозированием позвоночника и крупных суставов, значительным ухудшением качества жизни, длительной потерей трудоспособности, высокой инвалидизацией. Трудности борьбы с этим заболеванием связаны с неясностью этиопатогенетических механизмов и вследствие этого недостаточной эффективностью используемых лекарственных средств. Доказанная связь АС с антигеном HLA-B27 предполагает генетическую предрасположенность этого заболевания, но остается неясным – почему у некоторых здоровых людей носителей этого антигена заболевание не развивается, а у некоторых людей с

отсутствием HLA-B27 болезнь развивается. Учитывая, что генетическая предрасположенность к заболеваниям реализуется через метаболизм нуклеиновых кислот, мы в своей работе провели исследования активности 7 ферментов предшественников нуклеиновых кислот – пуриновых метаболитов: аденозиндезаминазы (АДА), АМФ-дезаминазы (АМФДА), адениндезаминазы (АД), гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуридиннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ) в иммунокомпетентных клетках крови – лимфоцитах больных АС в условиях стационарного лечения. В своих ранних исследованиях мы изучали активность ферментов отдельно по адениловой и гуаниловой ветви ПМ в плазме крови и эритроцитах больных АС [2, 3].

Цель исследования. Выявить особенности активности АДА, АМФДА, АД, ГДА,

ГЗДА, ПНФ и ГФ в лизатах лимфоцитов больных АС в зависимости от клинических проявлений заболевания для повышения качества диагностики и возможного участия ферментов пуринового метаболизма (ПМ) в патогенетических механизмах АС.

Материал и методы исследований

Под наблюдением находились 56 больных АС, из которых 50 (89,3%) мужчин и 6 (10,7%) женщин. Средний возраст больных ($M \pm m$) – $36,9 \pm 1,3$ лет, длительность болезни – $6,6 \pm 0,4$ лет. Диагноз АС устанавливался на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев [10]. Степень активности патологического процесса определялась в соответствии с рекомендациями Европейской лиги ревматологов и индекса БАСДАЙ [8]. Стадия поражения суставов и позвоночника устанавливалась на основании рентгенологических данных и индекса БАСРИ [9]. Функциональная недостаточность суставов и позвоночника определялась с учетом индекса БАСФИ [7]. I степень активности процесса установлена у 16 (28,6%), II степень – у 30 (53,6%) и III степень – у 10 (17,8%) больных. I стадия поражения суставов и позвоночника определялась у 6 (10,7%), II стадия – у 24 (42,9%), III стадия – у 20 (35,7%) и IV стадия – у 6 (10,7%) больных. Функциональная недостаточность суставов 0 степени (ФНС-0) установлена у 4 (7,1%), ФНС-1 – у 15 (26,8%), ФНС-2 – у 31 (55,4%) и ФНС-3 – у 6 (10,7%) больных. Быстро прогрессирующее течение (БПТ) выявлено у 15 (26,8%), медленно прогрессирующее течение (МПТ) – у 41 (73,2%) больного. По данным рентгенологических исследований наиболее часто поражались крестцовоподвздошные сочленения (100%), поясничный отдел позвоночника (85,7%), грудной отдел (66,1%), лонные сочленения (32%). Клинические проявления энтезопатий выявлены в 55,4% случаев, поражения сердечно-сосудистой системы – в 28,6%, патология почек – в 19,6% случаев. Комплексная терапия больных включала нестероидные противовоспалительные препараты, инфликсимаб, сульфасалазин, глюкокортикоиды (локально), лечебную физкультуру, массаж. Дозы и виды лечебных препаратов назначались в зависимости от тяжести заболевания. Контрольную группу составили 35 практически здоровых людей.

Выделение лимфоцитов из венозной крови проводили по методике Воупм [6] с использованием лимфосепа с плотностью 1,077-1,079 г/мл. Лизаты лимфоцитов готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания и центрифугирования. Активность ферментов определяли по оригинальным методикам, описанным в работах Н.М. Девятаевой [1] и Е.В. Кукушкиной [5] и выражали в нмоль/мин на 1 мл., содержащий 1×10^7 клеток (до лизиса). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0» с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), стандартного отклонения средней (σ). Достоверность различий считалась при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

По сравнению со здоровыми, у больных АС (всей группы) в лизатах лимфо-

цитов (табл. 1) выше активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ, ниже активность АДА и ГФ (все $p < 0,001$). Через 7-8 дней лечения (табл. 1) снизилась активность АД ($p < 0,001$), АМФДА ($p < 0,01$), повысилась ранее сниженная активность АДА ($p < 0,01$), незначительно снизилась активность ГДА, ГЗДА, ПНФ и повысилась активность ГФ (все $p > 0,05$). По окончании курса стационарного лечения по сравнению с начальным этапом (таблица), отмечалась положительная динамика индексов БАСДАЙ и БАСФИ ($p < 0,001$), симптомов Отто и Шобера ($p < 0,001$), Форестье ($p < 0,05$), Томайера ($p = 0,063$). В лимфоцитах снизилась активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ, повысилась ранее сниженная активность АДА и ГФ ($p < 0,001$). Перед выпиской не имели отличий от здоровых показатели активности АД, ПНФ, ГФ (все $p > 0,05$), но осталась повышенной активность ГДА и ГЗДА ($p < 0,001$), АМФДА (все $p < 0,01$) и сниженной активности АДА ($p < 0,01$).

Учитывая возможное влияние клинических особенностей АС на энзимную активность, были проведены соответствующие исследования. Так, у больных АС с БПТ по сравнению с больными МПТ в лимфоцитах (табл. 1) выше активность АМФДА, АД, ГЗДА (все $p < 0,001$), ниже активность АДА ($p = 0,0003$), ГФ ($p = 0,048$), незначительно выше активность ГДА ($p = 0,202$) и ниже ПНФ ($p = 0,198$).

У больных с I стадией поражения суставов и позвоночника (таблица) по сравнению с больными с II стадией в лимфоцитах выше активность АДА ($p = 0,038$), ниже активность АД ($p = 0,0003$), АМФДА ($p = 0,035$), незначительно ниже активность ГДА ($p = 0,066$), ГЗДА ($p = 0,051$), ПНФ ($p = 0,087$), выше ГФ ($p = 0,068$); по сравнению с больными с III стадией выше активность АДА ($p = 0,0004$), ГФ ($p = 0,027$), ниже активность АМФДА ($p = 0,0003$), АД ($p = 0,0002$), ГЗДА ($p = 0,0008$), незначительно ниже активность ГДА ($p = 0,059$) и ПНФ ($p = 0,086$); по сравнению с больными с IV стадией, выше активность АДА ($p = 0,0003$), ГФ ($p = 0,0005$), ниже активность АМФДА и АД (все $p < 0,001$), ГЗДА ($p = 0,0004$), незначительно ниже активность ГДА ($p = 0,132$) и выше ПНФ ($p = 0,462$). У больных с II стадией (табл. 1) по сравнению с больными с III стадией выше активность АДА ($p = 0,0003$), ГФ ($p = 0,047$), ниже активность АМФДА ($p = 0,0001$), АД ($p = 0,0002$), ГЗДА ($p = 0,042$), незначительно ниже активность ГДА ($p = 0,052$) и ПНФ ($p = 0,094$); по сравнению с больными с IV стадией выше активность АДА ($p = 0,0004$), ГФ ($p = 0,0024$), ниже активность АМФДА ($p = 0,0002$), АД ($p = 0,0003$), ГЗДА ($p = 0,0005$), незначительно ниже активность ГДА ($p = 0,316$) и выше ПНФ

($p=0,112$). У больных с III стадией (табл. 1) по сравнению с больными с IV стадией ниже активность АМФДА ($p=0,043$), АД ($p=0,045$),

ГЗДА ($p=0,048$), незначительно выше активность АДА ($p=0,055$), ГДА ($p=0,251$) и ПНФ ($p=0,143$).

Активность ферментов (нмоль/мин/мл) в лизатах лимфоцитов здоровых и больных АС

Контингент	Кол-во б-ных	Стат. пок-ли	АДА	АМФДА	АД	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ
Здоровые	35	М σ m	45,8 3,94 0,67	3,18 0,32 0,05	1,94 0,24 0,04	11,3 0,53 0,09	7,61 0,66 0,11	35,1 2,96 0,50	11,4 0,35 0,23
Больные АС, вся группа, поступление	56	М σ m	37,8 4,18 0,56	3,73 0,28 0,04	2,33 0,22 0,03	14,3 3,07 0,41	10,2 3,09 0,41	41,8 7,16 0,96	9,57 2,43 0,32
Больные АС, вся группа, через 7-8 дней лечения	56	М σ m	39,8 3,02 0,40	3,58 0,20 0,03	2,20 0,16 0,02	13,4 2,23 0,30	9,60 2,22 0,30	39,7 5,38 0,72	10,0 1,76 0,24
Больные АС, вся группа, по окончании лечения	56	М σ m	44,0 1,24 0,17	3,29 0,08 0,01	1,98 0,05 0,01	12,0 0,66 0,09	8,34 0,80 0,11	35,7 1,29 0,17	11,2 0,33 0,04
Больные АС, БПТ	15	М σ m	34,7 2,71 0,70	4,01 0,20 0,05	2,54 0,14 0,04	14,8 4,35 1,12	12,5 3,52 0,91	40,7 10,6 2,74	8,47 2,34 0,61
Больные АС, МПТ	41	М σ m	38,9 4,13 0,64	3,63 0,24 0,04	2,25 0,19 0,03	14,2 2,34 0,37	9,42 2,49 0,39	42,2 5,53 0,86	9,97 2,36 0,37
Больные АС, стадия I	6	М σ m	43,5 2,88 1,17	3,37 0,14 0,06	1,98 0,06 0,03	12,8 1,42 0,58	7,27 1,26 0,51	39,8 2,54 1,04	11,6 1,67 0,68
Больные АС, стадия II	24	М σ m	39,3 3,66 0,75	3,58 0,18 0,04	2,23 0,13 0,03	13,8 1,84 0,37	9,2 2,18 0,45	41,9 4,88 1,00	10,3 2,41 0,49
Больные АС, стадия III	20	М σ m	35,5 2,75 0,61	3,92 0,18 0,04	2,47 0,14 0,03	15,3 3,36 0,75	11,2 2,9 0,65	43,4 7,55 1,69	8,81 2,27 0,51
Больные АС, стадия IV	6	М σ m	33,5 0,69 0,28	4,11 0,07 0,03	2,60 0,07 0,03	14,1 5,97 2,44	14,2 3,33 1,36	38,6 14,3 5,83	7,28 0,44 0,18
Больные АС, I степень активности	16	М σ m	43,5 1,54 0,39	3,39 0,12 0,03	2,08 0,12 0,03	12,5 0,52 0,13	7,13 0,53 0,13	40,0 1,31 0,33	13,2 0,53 0,13
Больные АС, II степень активности	30	М σ m	36,4 1,87 0,34	3,83 0,20 0,04	2,39 0,17 0,03	16,7 1,55 0,28	10,0 0,76 0,14	47,1 2,61 0,48	8,42 0,55 0,10
Больные АС, III степень активности	10	М σ m	32,9 0,39 0,12	3,98 0,19 0,06	2,53 0,12 0,04	9,78 0,97 0,31	16,0 1,50 0,48	29,0 2,59 0,82	7,18 0,27 0,08

Деструкция суставов, позвоночника, околоуставных тканей, как правило, являются последствиями иммуно-воспалительного и дистрофического процессов, и их выраженность и длительность определяют степень деструкции или стадии поражения. Исходя из этого, нами были проведены исследования активности ферментов в зависимости от степени активности патологического процесса. Так, у больных с I степенью по сравнению со здоровыми (таблица) в лимфоцитах выше активность АМФДА ($p=0,0084$), АД ($p=0,0473$), ГДА ($p=0,0006$), ГЗДА ($p=0,0007$), ПНФ ($p=0,0006$), ниже активность АДА ($p=0,0462$) и ГФ ($p=0,0008$).

Если же учитывать индивидуальные энзимные показатели, а не среднестатистические величины активности энзимов, то за

пределы условной (нормы, рассчитанной по формуле $M \pm 2\sigma$, в лимфоцитах выходили только показатели ГДА в 56,3% случаев и ПНФ – в 31,3% случаев. У этих же больных за пределы нормы выходили показатели СОЭ, СРБ и сиаловых кислот в 37,5%, 37,5% и 25% случаев, соответственно. То есть, показатели ПНФ оказались более информативными в отражении минимальной активности процесса, чем общепринятые острофазовые показатели.

За период стационарного лечения нормализовалась активность АДА, АМФДА, АД, ПНФ, ГФ и только активность ГДА ($p=0,0006$) и ГЗДА ($p=0,0007$) осталась повышенной.

По сравнению со здоровыми у больных АС с II степенью (табл. 1) в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГДА,

ГЗДА, ПНФ, ниже АДА и ГФ (все $p < 0,001$), у больных АС с III степенью выше активность АМФДА, АД, ГЗДА, ниже активность АДА, ГДА, ПНФ и ГФ (все $p < 0,001$).

После проведенного курса стационарного лечения у больных с II степенью нормализовались активности АД и ГФ, но активность АДА осталась ниже, чем у здоровых ($p < 0,01$), а активности АМФДА ($p < 0,05$), ГДА и ГЗДА ($p < 0,001$), ПНФ ($p < 0,01$) остались выше, чем у здоровых; у больных АС с III степенью нормализовались активности АМФДА, АД, ПНФ, ГФ, но остались ниже активности АДА и ГДА ($p < 0,05$) и выше ГЗДА (все $p < 0,0001$).

Сравнительные исследования показали, что у больных АС с I степенью по сравнению с больными с II степенью, в лимфоцитах выше активность АДА и ГФ ($p < 0,0001$), ниже активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА и ПНФ (все $p < 0,001$); по сравнению с больными с III степенью выше активность АДА, ГФ, ГДА, ПНФ, ниже АМФДА, АД и ГЗДА (все $p < 0,001$).

У больных с II степенью по сравнению с больными с III степенью, выше активность АДА, ГДА, ПНФ, ГФ (все $p < 0,001$), ниже активность АД ($p = 0,0425$), ГЗДА (все $p < 0,0001$), незначительно ниже активность АМФДА ($p = 0,0542$).

Анализ энзимных показателей в зависимости от клинических проявлений АС выявил некоторые закономерности изменений активности ферментов. Так, чем острее течение заболевания, тем в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ниже АДА, ПНФ и ГФ. Чем больше стадия поражения суставов и позвоночника, тем ниже активность АДА, ГФ, выше АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА. Чем выше активность процесса, тем в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГЗДА, ниже активность АДА, ПНФ и ГФ. Одной из особенностей активности ферментов в лимфоцитах больных АС с высокой (II-III) степенью активности патологического процесса является сниженная активность АДА и ПНФ. Если рассматривать этот феномен с биохимических позиций и учитывать, что аденозин и гуанозин являются естественными субстратами АДА и ПНФ, то логично предположить, что при дефиците этих ферментов в лимфоцитах будет происходить накопление этих субстратов. Сниженные активности АДА и ПНФ не могут быть объяснены низким содержанием их субстратов, так как при исследовании активности этих ферментов *in vitro* были использованы оптимальные концентрации субстратов. Повышенное содержание аденозина и гуанозина в лимфоцитах, по данным литературы, может существен-

но нарушить процессы созревания, дифференциации, пролиферации лимфоцитов, стимулировать аденилатциклазу, что влечет накопление циклического аденозинмонофосфата и повышенную выработку фактора некроза опухоли-альфа [4]. То есть, избыточное содержание аденозина и гуанозина в лимфоцитах больных АС при дефиците АДА и ПНФ может существенно нарушить иммунорегуляторные процессы и составить отдельные звенья патогенеза АС.

Выводы

1. У больных АС по сравнению со здоровыми в лизатах лимфоцитов выше активность АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ, ниже активность АДА и ГФ.
2. Между стадиями поражения суставов и позвоночника, вариантами течения и степенями активности процесса выявлены статистически значимые энзимные различия, способствующие их дифференциации.
3. Чем острее течение заболевания, больше стадия поражения, выше степень активности процесса, тем в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГЗДА, ниже активность АДА, ПНФ и ГФ.
4. Исследования активности ферментов в лимфоцитах больных АС в процессе лечения способствуют объективизации оценки эффективности назначенной терапии.
5. Дефицит активности АДА и ПНФ в лимфоцитах при высоком содержании аденозина и гуанозина у больных АС может обусловить нарушения иммунорегуляторных процессов и составить отдельные звенья патогенеза АС.

Список литературы

1. Девятаева Н.М. Клинико-диагностическое значение исследования активности 5'-нуклеотидазы, АМФ-дезаминазы, адениндезаминазы, аденозиндезаминазы в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных системной красной волчанкой: Дис. ... канд. мед. наук. Волгоград, 2005. 226 с.
2. Евдокимова Е.В., Зборовский А.Б., Мозговая Е.Э., Стажаров М.Ю., Бедина С.А., Мартемьянов В.Ф. Активность энзимов пуринового метаболизма в плазме крови больных серонегативными спондилоартритами // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. С. 626. URL: <http://www.science-education.ru/113-11274>.
3. Зборовский А.Б., Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Слюсарь О.П., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Клинико-диагностическое значение исследования активности ферментов гуаниловой ветви пуринового метаболизма у больных анкилозирующим спондилоартритом // Терапевтический архив. 2010. Т. 82. № 4. С. 48-52.
4. Дмитренко Н.П. Аденозин, его метаболизм и возможные механизмы участия в функции клеток иммунной системы // Успехи современной биологии. 1984. Т. 97, № 9. С. 20-35.
5. Кукушкина Е.В. Клинико-патогенетическое значение исследования активности энзимов гуаниловой ветви пуринового метаболизма в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных ревматоидным артритом: Дис. ... канд. мед. наук. Волгоград, 2010. 236 с.

6. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand.I. Clin. Lab. Invest. 1968. Vol. 21. Suppl. 97 (Paper IV). P. 77-89.
7. Calin A., Garrett S., Whitelock H. et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index // J. Rheumatol. 1994. Vol. 21. P. 2281-2285.
8. Garret S., Jenkinson T., Kennedy L.G. et al. A new approach to defining disease status in Ankylosing Spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index // J. Rheumatol. 1994. Vol. 21. P. 2286-2291.
9. Mac Kay K., Mack C., Brophy S., Calin A. The Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index (BASRI): A new validated approach to Disease Assessment // Arthritis Rheum. 1998. Vol. 41. № 12. P. 2263-2270.
10. Van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. Evolution of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria // Arthritis Rheum. 1984. Vol. 27. P. 361-368.