

УДК 616-002.77

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ АКТИВНОСТИ
ЭНЗИМОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИЗАТАХ ЭРИТРОЦИТОВ
И ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ****¹Мартемьянов В.Ф., ¹Бедина С.А., ¹Мозговая Е.Э., ²Королик О.Д., ¹Зборовская И.А.**¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной
ревматологии», Волгоград, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: okorolik@yandex.ru

В лизатах эритроцитов и плазме крови 84 больных ревматоидным артритом (РА) определялись активность аденозиндеаминазы (АДА), пуриноклеозидфосфорилазы (ПНФ), ксантиндегидрогеназы (КДГ) и их изоферментов в процессе стационарного лечения. Выявлена зависимость активности ферментов от клинических проявлений заболевания. Показано, что у больных РА в плазме повышена активность ПНФ, снижена КДГ, меньше изоферменты АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1, в эритроцитах повышена активность ПНФ и снижена КДГ. Чем выше степень активности патологического процесса, тем в эритроцитах ниже активность КДГ, в плазме ниже активность АДА, КДГ, меньше изоферменты АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1, выше активность ПНФ. Определение активности ферментов пуринового метаболизма в лизатах эритроцитов и плазме крови при РА может способствовать объективизации оценки эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, аденозиндеаминаза, пуриноклеозидфосфорилаза, ксантиндегидрогеназа, лизаты эритроцитов, плазма крови

**THE CLINICAL DIAGNOSTIC VALUE OF A STUDY OF THE ACTIVITY OF ENZYMES
OF THE PURINE METABOLISM IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS****¹Martemyanov V.F., ¹Bedina S.A., ¹Mozgovaya E.E., ²Korolik O.D., ¹Zborovskaya I.A.**¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology»,
Volgograd, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;²The Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: okorolik@yandex.ru

Adenosine deaminase (ADA), Purine nucleoside phosphorylase (PNP), Xanthine dehydrogenase (XDG) activities and ADA isoenzymes, PNP isoenzymes, XDG isoenzymes were determined in erythrocytes lysates and blood plasma of 84 rheumatoid arthritis (RA) patients during hospital treatment. The enzyme activities were dependent on the clinical manifestations of the disease. It is shown that in patients with RA in blood plasma increased activity of PNP, reduced activity of XDG, the decrease of ADA-1 isoenzymes, PNP-1 isoenzymes, XDG-1 isoenzymes, in erythrocytes lysates increased activity of PNP and reduced activity of XDG. The increase of the pathological process activity was accompanied by the decrease of XDG activities in lysates of erythrocytes, the decrease of ADA, XDG activities, ADA-1 isoenzymes, PNP-1 isoenzymes, XDG-1 isoenzymes, the increase of PNP activities in blood plasma. Determination of the purine metabolism enzymes activities in erythrocytes lysates and blood plasma of RA patients may contribute evaluation of the therapy effectiveness.

Keywords: rheumatoid arthritis, Adenosine deaminase, Purine nucleoside phosphorylase, Xanthine dehydrogenase, erythrocytes lysates, blood plasma

Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее тяжелых хронических ревматических заболеваний суставов, характеризующимся прогрессирующим течением, ранней потерей трудоспособности, высоким процентом инвалидности и значительным ухудшением качества жизни. Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в диагностике и лечении РА добиться существенных результатов в этой области не удалось. И связано это с неясностью отдельных вопросов этиопатогенеза. Большинство современных теорий патогенеза РА несут иммунологическую направленность. Но, так как применение иммуномоделирующих препаратов в лечении больных РА не всегда приводит к желаемому эффекту, можно

предположить, что иммунные нарушения являются следствием каких-то других процессов. В предыдущих своих работах мы изучали активность энзимов пуринового метаболизма в лимфоцитах и сыворотке крови [2, 3]. Настоящее исследование посвящено изучению аденозиндеаминазы (АДА), пуриноклеозидфосфорилазы (ПНФ), ксантиндегидрогеназы (КДГ) в эритроцитах и плазме крови больных РА.

Цель исследования

Выявление особенностей активности АДА, ПНФ, КДГ и их изоферментов в лизатах эритроцитов и плазме крови больных РА в зависимости от активности процесса и проводимой терапии.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением в стационаре находились 84 больных РА, из которых 58 (69%) женщин и 26 (31%) мужчин. Средний возраст больных ($M \pm m$) – $42,5 \pm 0,9$ лет, средняя продолжительность заболевания – $8,52 \pm 0,34$ лет. Диагностика РА проводилась в ходе всестороннего клинико-инструментального обследования с использованием модифицированных диагностических критериев Американской ассоциации ревматологов [5]. Активность патологического процесса определялась на основании диагностических критериев в соответствии с рабочей классификацией и индекса ДАС28(3) [6]. I степень активности ревматоидного процесса определялась у 17 (20,2%) больных, II степень – у 52 (61,9%) и III степень – у 15 (17,9%) больных. Серопозитивная форма РА отмечалась у 61 (76,3%) больного. Системные поражения наблюдались у 30 (35,7%) больных. В лечении использовался комплексный подход с использованием нестероидных противовоспалительных препаратов, метотрексата, сульфасалазина, глюкокортикоидов, физиотерапии в зависимости от степени активности процесса. Контрольную группу составили 35 практически здоровых людей.

В лизатах эритроцитов и плазме крови определяли активность АДА, ПНФ, КДГ и в плазме крови изоферменты АДА, ПНФ и КДГ. Активность энзимов определяли по оригинальным методикам, изоферменты АДА, ПНФ и КДГ в плазме крови разделяли методом зонального электрофореза в 1% агарозном геле и выявляли с использованием нитросинего тетразолия и феназинметосульфата [1]. Активность ферментов в плазме выражали в нмоль/мин/мл., в эритроцитах – 1×10^9 клеток, за исключением активности ПНФ, которая рассчитывалась из содержания 1×10^8 клеток. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программы «STATISTICA 6.0» с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), квадратического отклонения (σ). При сравнении групп по количественному признаку использовались критерии Стьюдента и Манна-Уитни. Достоверность различий считалась при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Активность АДА, ПНФ и КДГ в плазме крови и лизатах эритроцитов у здоровых не зависела от пола и возраста, и это позволило нам не учитывать эти факторы у больных РА. Изоферменты АДА, ПНФ и КДГ в плазме крови были представлены тремя фракциями, но учитывая, что промежуточная фракция часто нечетко разделялась с 3-й фракцией (счет фракций от анода), мы ее при денситометрии объединяли с 3 фракцией. 1-я фракция, находящаяся в области альбуминов, четко отделялась от других фракций. Исходя из этого, в работе мы использовали данные только по 1-й фракции, которая выражалась в процентах (все фракции принимались за 100%).

При поступлении на лечение, по сравнению со здоровыми, у больных РА (всей группы) в плазме (табл. 1) выше актив-

ность ПНФ ($p < 0,001$), ниже активность КДГ, меньше изоферменты АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (все $p < 0,001$), незначительно ниже активность АДА ($p > 0,05$); в эритроцитах (табл. 2) выше активность ПНФ, ниже КДГ ($p < 0,001$), незначительно выше АДА ($p > 0,05$).

Через 7-8 дней лечения в плазме снизилась активность ПНФ ($p < 0,001$), повысилась ранее сниженная активность КДГ ($p < 0,001$), увеличились АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (все $p < 0,001$), незначительно повысилась активность АДА ($p > 0,05$); в эритроцитах снизилась активность ПНФ ($p < 0,05$), повысилась активность КДГ ($p < 0,01$), незначительно снизилась активность АДА ($p > 0,05$).

По окончании лечения по сравнению с начальным этапом в плазме (табл. 1) ниже активность ПНФ ($p < 0,001$), выше КДГ ($p < 0,001$), больше изоферменты АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (все $p < 0,001$), незначительно выше активность АДА ($p > 0,05$); в эритроцитах (табл. 2) ниже активность АДА ($p < 0,01$), ПНФ ($p < 0,001$), выше КДГ ($p < 0,001$).

При выписке из стационара в плазме активность не имела отличий от здоровых активность АДА, КДГ и КДГ-1 ($p > 0,05$), но осталась повышенной активность ПНФ ($p < 0,05$) и меньше АДА-1 и ПНФ-1 ($p < 0,001$); в эритроцитах не имела отличий от здоровых активность АДА ($p > 0,05$), но остались выше активность ПНФ ($p < 0,001$) и ниже КДГ ($p < 0,001$). Индекс ДАС28 уменьшился на 27,5% ($p < 0,001$).

У больных РА с I степенью по сравнению со здоровыми при поступлении на лечение в плазме (табл. 1) выше активность АДА, ПНФ, ниже КДГ, меньше АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2) выше активность АДА, ПНФ и ниже КДГ (все $p < 0,001$).

За референтные пределы здоровых ($M \pm m$) в плазме выходили изоферменты ПНФ-1 в 100% случаев, АДА-1 и КДГ-1 в 88,2% случаев; в эритроцитах – активность АДА и ПНФ в 100% случаев. У этих же больных показатели СОЭ и СРБ превышали норму в 35,3% случаев.

Через 7-8 дней лечения в плазме снизилась активность ПНФ ($p < 0,001$), АДА ($p < 0,05$), увеличились фракции ПНФ-1 ($p < 0,01$); в эритроцитах снизилась активность АДА, ПНФ (все $p < 0,001$) и незначительно КДГ ($p > 0,05$).

По окончании курса лечения по сравнению с начальным этапом в плазме (табл. 1) ниже активность АДА, ПНФ, выше КДГ, больше АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2)

ниже активность АДА, ПНФ, выше КДГ (все $p < 0,001$). При выписке из стационара в плазме не имела отличий от здоровых активность АДА, КДГ и КДГ-1 ($p > 0,05$), но осталась повышенной активность ПНФ ($p < 0,05$) и меньше АДА-1 и ПНФ-1 ($p < 0,001$); в эритроцитах не имела отличий от здоровых активность КДГ ($p > 0,05$), но остались повышенными активности ПНФ ($p < 0,05$) и АДА ($p < 0,001$).

У больных РА с II степенью по сравнению со здоровыми при поступлении на лечение в плазме (табл. 1) выше активность ПНФ, ниже АДА, КДГ, меньше изоферменты АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2) выше активность ПНФ, ниже КДГ (все $p < 0,001$) и АДА ($p < 0,05$).

Через 7-8 дней лечения в плазме снизилась активность ПНФ, повысилась активность АДА, КДГ, увеличились АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроци-

тах снизилась активность ПНФ ($p < 0,001$), повысилась КДГ ($p < 0,001$) и незначительно снизилась активность АДА ($p > 0,05$).

По окончании лечения по сравнению с начальным этапом в плазме (табл. 1) снизилась активность ПНФ, повысилась активность АДА, КДГ, увеличились АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2) снизилась активность ПНФ ($p < 0,001$), АДА ($p < 0,01$), повысилась активность КДГ ($p < 0,001$), уменьшился индекс ДАС28 ($p < 0,001$). По сравнению со здоровыми при выписке из стационара в плазме не имела отличий активность АДА ($p > 0,05$), но осталась повышенной активность ПНФ ($p < 0,001$) и сниженной КДГ ($p < 0,001$), меньше АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах не имела отличий активности АДА ($p > 0,05$), но осталась повышенной активность ПНФ и сниженной КДГ (все $p < 0,001$).

Таблица 1

Активность ферментов (в нмоль/мин/мл) и изоферментов АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1 (в процентах) в плазме крови у больных РА в процессе лечения

Контингент	Статистические показатели	АДА	ПНФ	КДГ	АДА-1	ПНФ-1	КДГ-1
Здоровые, n = 35	M σ m	7,43 1,09 0,18	0,86 0,07 0,01	5,35 0,32 0,05	85,4 0,66 0,11	78,6 1,43 0,24	80,5 1,34 0,23
Поступление							
Больные РА (вся группа), n = 84	M σ m	7,07 1,70 0,19	1,19 0,10 0,01	4,39 0,35 0,04	75,3 4,56 0,50	68,8 3,36 0,37	73,6 2,68 0,29
Больные РА, I степень активности, n = 17	M σ m	9,98 0,96 0,23	1,06 0,06 0,01	4,77 0,26 0,06	82,3 1,78 0,43	73,8 0,98 0,24	77,3 1,43 0,35
Больные РА, II степень активности, n = 52	M σ m	6,72 0,38 0,05	1,21 0,08 0,01	4,40 0,19 0,03	74,7 2,38 0,33	68,5 1,92 0,27	73,4 1,41 0,20
Больные РА, III степень активности, n = 15	M σ m	5,00 0,54 0,14	1,28 0,05 0,01	3,88 0,26 0,07	69,5 1,52 0,39	64,4 0,76 0,20	69,8 0,84 0,22
Выписка							
Больные РА (вся группа), n = 84	M σ m	7,36 0,30 0,03	0,93 0,04 0,004	5,11 0,13 0,01	81,9 1,62 0,18	75,5 1,32 0,14	78,7 0,99 0,11
Больные РА, I степень активности, n = 17	M σ m	7,59 0,13 0,03	0,89 0,01 0,003	5,21 0,11 0,03	84,5 0,72 0,17	77,3 0,42 0,10	79,9 0,40 0,10
Больные РА, II степень активности, n = 52	M σ m	7,40 0,25 0,03	0,92 0,02 0,004	5,12 0,11 0,02	81,6 0,61 0,08	75,4 0,92 0,13	78,7 0,56 0,08
Больные РА, III степень активности, n = 15	M σ m	6,95 0,19 0,05	0,98 0,04 0,01	4,99 0,12 0,03	79,8 0,41 0,11	73,9 0,52 0,14	77,2 0,43 0,11

Таблица 2

Активность ферментов (в нмоль/мин/мл) в лизатах эритроцитов и ДАС-28 (3)
у больных РА в процессе лечения

Контингент	Статистические показатели	Лизаты эритроцитов			ДАС-28(3)
		АДА	ПНФ	КДГ	
Здоровые, n = 35	M σ m	36,8 3,27 0,55	178,2 12,9 2,17	48,9 2,41 0,41	–
Поступление					
Больные РА (вся группа), n = 84	M	40,4	215,3	36,3	4,29
	σ	10,7	34,5	5,79	1,19
	m	1,17	3,76	0,63	0,13
Больные РА, I степень активности, n = 17	M	57,1	222,5	44,0	3,00
	σ	2,16	6,62	3,08	0,12
	m	0,52	1,60	0,75	0,03
Больные РА, II степень активности, n = 52	M	39,1	233,4	36,5	4,09
	σ	5,08	7,58	2,42	0,52
	m	0,71	1,05	0,34	0,07
Больные РА, III степень активности, n = 15	M	25,6	144,4	27,0	6,41
	σ	1,80	11,9	1,66	0,67
	m	0,46	3,07	0,43	0,17
Выписка					
Больные РА (вся группа), n = 84	M	36,9	187,5	44,0	3,11
	σ	2,59	9,21	3,25	0,39
	m	0,28	1,01	0,35	0,04
Больные РА, I степень активности, n = 17	M	40,2	185,0	47,9	2,75
	σ	1,86	5,96	0,94	0,12
	m	0,45	1,45	0,23	0,03
Больные РА, II степень активности, n = 52	M	36,9	192,0	44,3	3,06
	σ	0,80	6,85	1,65	0,26
	m	0,11	0,95	0,23	0,04
Больные РА, III степень активности, n = 15	M	33,1	174,5	38,6	3,69
	σ	2,20	5,41	1,01	0,32
	m	0,57	1,40	0,26	0,08

У больных РА с III степенью по сравнению со здоровыми при поступлении в плазме (табл. 1) выше активность ПНФ, ниже АДА, КДГ, меньше АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2) ниже АДА, ПНФ и КДГ (все $p < 0,001$).

Через 7-8 дней лечения в плазме снизилась активность ПНФ ($p < 0,001$), повысилась АДА ($p < 0,001$) и КДГ ($p < 0,01$), увеличились АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах повысились активности КДГ ($p < 0,001$), ПНФ ($p < 0,01$) и АДА ($p < 0,05$).

По окончании лечения в плазме (табл. 1) по сравнению с начальным этапом снизилась активность ПНФ, повысились АДА и КДГ, увеличились АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 ($p < 0,001$); в эритроцитах (табл. 2) повысилась активность всех ферментов ($p < 0,001$). При выписке из стационара в плазме не имела отличий от здоровых активность АДА ($p > 0,05$), но осталась повышенной активность ПНФ и сниженной КДГ, меньше изоферменты

АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1 (все $p < 0,001$); в эритроцитах только активность ПНФ не имела отличий от здоровых ($p > 0,05$), но активности АДА и КДГ остались сниженными ($p < 0,001$).

Сравнительные исследования показали, что у больных РА с I степенью по сравнению с больными РА с II степенью в плазме выше активность АДА, КДГ, больше изоферменты АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1, ниже активность ПНФ (все $p < 0,001$); в эритроцитах выше активность АДА, КДГ и ниже ПНФ (все $p < 0,001$); по сравнению с больными РА с III степенью в плазме выше активность АДА, КДГ, больше АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1, ниже активность ПНФ (все $p < 0,001$); в эритроцитах выше активность АДА, ПНФ и КДГ (все $p < 0,001$).

При II степени по сравнению с III степенью в плазме выше активность АДА, КДГ, больше АДА-1, ПНФ-1, КДГ-1, ниже активность ПНФ (все $p < 0,001$); в эритроцитах выше активность АДА, ПНФ и КДГ (все $p < 0,001$).

Результаты проведенных исследований показали наличие существенных изменений активности АДА, ПНФ, КДГ в плазме крови и лизатах эритроцитов, зависящие от выраженности воспалительного процесса. Даже при минимальной активности ревматоидного процесса, которую в клинической практике нередко трудно дифференцировать от фазы клинической ремиссии, энзимные и изоэнзимные показатели оказались более чувствительными в отражении активности процесса, по сравнению с общепринятыми острофазовыми показателями, такими как СОЭ, СРБ. При назначении терапии у больных РА с I степенью и оценки ее эффективности в первую неделю лечения показатели активности ПНФ в плазме, АДА и ПНФ в эритроцитах более четко отражали ее адекватность, чем СОЭ и СРБ. Выявленные энзимные различия между степенями активности процесса способствуют более точной диагностике. Анализ результатов энзимных показателей крови больных РА после проведенного курса стационарного лечения показал, что большинство энзимных и изоэнзимных показателей, несмотря на существенную положительную динамику в процессе лечения, так и не достигли уровня здоровых лиц, что свидетельствует о необходимости продолжения активной терапии в амбулаторных условиях.

Выводы

1 Исследования активности АДА, ПНФ, КДГ и их изоферментов в лизатах эритроци-

тов и плазме крови больных РА способствуют уточнению степени активности ревматоидного процесса и объективизации оценки эффективности проводимой терапии.

2. Чем выше степень активности патологического процесса при РА, тем в плазме выше активность ПНФ, ниже активность АДА, КДГ, меньше изоферменты АДА-1, ПНФ-1 и КДГ-1; в эритроцитах ниже активность КДГ.

Список литературы

1. Мартемьянов В.Ф., Зборовский А.Б., Стажаров М.Ю., Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Черных Т.П. Активность энзимов пуринового метаболизма при ревматоидном артрите, остеоартрозе и подагре // Вестник Волгоградской медицинской академии. – 2000. – Т. 56, № 6. – С. 104–107.
2. Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Мозговая Е.Э., Бедина С.А., Герусов Ю.И., Зборовский А.Б. Энзимы пуринового метаболизма в диагностике и дифференциальной диагностике ревматоидного артрита и остеоартроза // Доктор. Ру. – 2008. – № 3 (40). – С. 80–83.
3. Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Мозговая Е.Э., Бедина С.А., Зборовская И.А., Галаева О.Ю. Активность энзимов пуринового метаболизма в лизатах лимфоцитов больных ранним ревматоидным артритом // Клиническая больница. – 2013. – № 1(4). – С. 94.
4. Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите // Врач-аспирант. – 2011. – Т. 47. – № 4. – С. 45–50.
5. Ревматология: Клинические рекомендации / Под ред. акад. РАМН Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 346 с.
6. Arnett F.C., Edworth S.M., Bloch D.A. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 1988. – Vol. 31. – P. 315–324.