

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АДЕНИЛОВОЙ ВЕТВИ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

А. Б. Зборовский, И. С. Ушакова

ГУ НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН,
кафедра госпитальной терапии ВолГМУ,
МСЧ № 2, г. Норильск

В лизатах лимфоцитов и эритроцитов периферической крови у 77 больных ревматоидным артритом (РА) определялись активность аденозиндезаминазы (АДА), адениндезаминазы (АД) и АМФ-дезаминазы (АМФДА) при поступлении на лечение, через 10–12 дней и по окончании курса лечения. У больных РА при поступлении в стационар выявлено в лизатах эритроцитов повышение активности АМФДА и АД, в лимфоцитах – снижение активности АДА, АД и повышение активности АМФДА. Исследования активности энзимов способствовали диагностике активности патологического процесса и объективизации контроля эффективности терапии больных РА.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, адениндезаминаза, АМФ-дезаминаза, ревматоидный артрит.

CLINICAL AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EVALUATION OF ENZYME ACTIVITY OF PURINE METABOLISM ADENYL BRANCH IN RHEUMATOID ARTHRITIS

A. B. Zborovsky, I. S. Uchakova

Abstract. The activity of adenosine deaminase (ADA), adenine deaminase (AD) and AMP-deaminase (AMPDA) in lymphocyte and erythrocyte lysates of peripheral blood was studied in 77 patients with rheumatoid arthritis (RA) upon admission to hospital, after 10–12 days of treatment and on completion of inpatient care course.

While the AMPDA and AD activity was increased in erythrocyte lysates in patients with RA upon admission to hospital, the ADA, AD activity was reduced in lymphocytes, with AMPDA activity increased.

The enzymatic studies made it possible to diagnose the activity of the pathological process and the efficiency of a complex treatment of the patients with RA.

Key words: adenosine deaminase, adenine deaminase, AMP-deaminase, rheumatoid arthritis.

Ревматоидный артрит (РА) относится к наиболее тяжелым ревматическим заболеваниям суставов, характеризующимся неуклонно прогрессирующим течением, быстро приводящим к стойкой потере трудоспособности (до 50 % инвалидизации за первые 5 лет болезни), значительными материальными затратами на лечение, сокращением продолжительности жизни на 5–10 лет, что делает борьбу с РА выраженной медико-социальной проблемой [3].

Решение этой проблемы значительно осложняется неясностью этиопатогенеза болезни, сложностью диагностики вялотекущих форм РА, и, вследствие этого, работы в этом направлении нам представляются актуальными и перспективными.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Повысить качество диагностики активности патологического процесса при РА, объективизацию контроля эффективности проводимой терапии с использованием показателей активности энзимов пуринового метаболизма: аденозиндезаминазы (АДА), адениндезаминазы (АД), АМФ-дезаминазы (АМФДА) и выяснить роль этих энзимов в патогенезе РА.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением в условиях стационара находились 77 больных РА, из которых 57 (74 %) женщин и 20 (26 %) мужчин. Средний возраст больных – $42,3 \pm 1,0$ лет, средняя продолжительность болезни – $8,8 \pm 0,4$ лет.

I степень активности патологического процесса установлена в 19,5 % случаев, II – в 64,9 % и III – в 15,6 % случаев. Серопозитивная форма РА отмечалась в 76,6 %, серонегативная – в 23,4 %, медленно-прогрессирующее течение (МПТ) – в 64,9 %, быстро прогрессирующее (БПТ) – в 35,1 %, форма с системными поражениями – в 33,8 %, суставная – в 66,2 % случаев.

На основании рентгенологических исследований I стадия поражения суставов определялась в 9,1 % случаев, II – в 51,9 %, III – в 31,2 % и IV стадия – в 7,8 % случаев; ФК-2 – в 42,9 %, ФК-3 – в 49,4 %, ФК-4 – в 7,8 % случаев.

Контрольную группу составили 33 практически здоровых людей (доноры станции переливания крови) в возрасте 18–55 лет. Средний возраст – $35,9 \pm 2,1$ лет.

Выделение лимфоцитов и эритроцитов из периферической венозной крови проводилось

с использованием лимфосепа (Lymph separation medium) фирмы "JCN Biomedical" и силиконированной посуды [2]. Лизаты клеток готовили путем замораживания-оттаивания клеточной суспензии.

Активность АДА, АД и АМФДА в клеточных лизатах определяли по аммиаку с использованием фенол-гипохлоритного реактива в реакции Бертло и выражали в нмоль/мин/мл, исходя из содержания в 1 мл лизата лимфоцитов (до лизиса) 1×10^7 клеток, а для эритроцитов – 1×10^9 клеток [1].

У всех больных также определялись: общий анализ крови и мочи, общий белок и белковые фракции крови, сиаловые кислоты, С-реактивный белок (СРБ), ревматоидный фактор (РФ), циркулирующие иммунные комплексы, иммуноглобулины, антинуклеарный фактор.

В лечении больных РА использовались симптом-модифицирующие препараты (индометацин 75 мг/сут., диклофенак 75–100 мг/сут., мелоксикам 15 мг/сут.), болезнь-модифицирующие препараты (метотрексат 10–20 мг/нед., Д-пеницилламин 150–450 мг/сут., сульфасалазин 2,0 г/сут., инфликсимаб 3 мг/кг веса, люфлунамид 20 мг/сут.). Глюкокортикоиды (метипред, преднизолон) в основном использовались локально (внутрисуставно) в дозе 20–40 мг/сут. Дозы и виды препаратов, их сочетания зависели от степени активности процесса, тяжести заболевания. В комплексную терапию также входили различные методы физиотерапии, лечебная физкультура. Продолжительность лечения $18 \pm 4,6$ дней.

Обработка полученных результатов проводилась на ПК с использованием программного пакета "Statistica 6.0" с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), стандартного отклонения (σ), параметрического t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми расценивались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Существенных энзимных различий в лизатах лимфоцитов и эритроцитов здоровых людей в зависимости от пола и возраста выявлено не было.

У больных РА с I степенью активности патологического процесса при поступлении на лечение по сравнению со здоровыми в лизатах эритроцитов (табл. 1) выше активность АДА и ниже АД, в лизатах лимфоцитов (табл. 2) – ниже активность АДА.

При сравнении не среднестатистических величин активности энзимов, а индивидуальных энзимных показателей, активность всех энзимов

в лимфоцитах ни у одного больного не выходила за референтные пределы здоровых людей (условная норма: $M \pm 2\sigma$), а в эритроцитах у всех больных активность АДА превышала верхний уровень нормы. В то же время у этих же больных отклонения от уровня здоровых лиц отмечались для СОЭ, СРБ, γ -глобулинов, сиаловых кислот в 33,3 % случаев, α -2-глобулинов – в 40 % и ЦИК – в 20 % случаев.

Таким образом, показатели активности АДА в эритроцитах больных РА являются значительно более чувствительными и информативными в индикации минимальной активности ревматоидного процесса, чем самые демонстративные в этом аспекте общепринятые иммунобиохимические показатели.

Через 10–12 дней лечения по сравнению с исходным фоном в лизатах эритроцитов существенно снизилась активность АДА ($p < 0,001$) и наметилась тенденция к повышению АД, в лизатах лимфоцитов повысилась активность АДА ($p < 0,05$) и несколько снизилась активность АМФДА ($p = 0,06$).

По окончании курса стационарного лечения наблюдалась положительная динамика всех энзимных показателей, и перед выпиской из стационара активность всех энзимов в лимфоцитах, АМФДА и АД в эритроцитах не имела отличий от здоровых, и только активность АДА в эритроцитах так и осталась повышенной ($p < 0,01$).

Индекс DAS 28 за период стационарного лечения уменьшился на 43,5 % ($p < 0,001$) и составил $1,61 \pm 0,05$ баллов, что соответствует фазе клинической ремиссии.

У больных РА с системными поражениями по сравнению с суставной формой в эритроцитах выше активность АД ($p < 0,01$), в лимфоцитах выше активность АМФДА ($p < 0,01$) и ниже АД ($p < 0,001$).

У больных с БПТ по сравнению с МПТ только ниже активность АД ($p < 0,001$) в лимфоцитах.

У больных с серопозитивной формой РА по сравнению с серонегативной в эритроцитах ниже активность АДА ($p < 0,001$), выше АМФДА ($p < 0,001$) и АД ($p < 0,01$), в лимфоцитах ниже активность АДА ($p < 0,001$).

У больных РА со II степенью активности процесса при поступлении на лечение по сравнению со здоровыми в эритроцитах выше активность АМФДА и АД ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность АДА, АД и выше АМФДА ($p < 0,001$).

Через 10–12 дней лечения по сравнению с исходным фоном в эритроцитах снизилась активность АМФДА ($p < 0,001$) и АД ($p < 0,05$), в лимфоцитах повысилась ранее сниженная активность АДА ($p < 0,001$) и снизилась АМФДА ($p < 0,001$).

Активность АДА, АД и АМФДА в лизатах эритроцитов здоровых и больных РА в процессе лечения

Контингент	Кол-во больных	Стат. показатели	До лечения			После лечения		
			АДА	АД	АМФДА	АДА	АД	АМФДА
Здоровые	33	<i>M</i> <i>m</i>	37,0 0,72	13,2 0,35	22,1 0,81	–	–	–
РА, I степень активности	15	<i>M</i> <i>m</i>	58,0 ^{***} 0,64	9,50 ^{**} 0,27	24,1 [*] 0,48	40,5 0,69	12,1 0,15	23,1 0,17
Суставная форма	12	<i>M</i> <i>m</i>	58,6 ^{***} 0,69	9,13 ^{***} 0,23	24,5 0,50	–	–	–
Системная форма	3	<i>M</i> <i>m</i>	55,6 ^{***} 0,0	10,9 0,30	22,6 1,05	–	–	–
БПТ	3	<i>M</i> <i>m</i>	57,1 ^{***} 1,47	9,97 ^{**} 0,62	23,1 0,90	–	–	–
МПТ	12	<i>M</i> <i>m</i>	58,2 ^{***} 0,72	9,36 ^{***} 0,30	24,4 0,55	–	–	–
Серопозитивная форма	10	<i>M</i> <i>m</i>	56,5 ^{***} 0,42	10,0 ^{***} 0,23	25,1 0,41	–	–	–
Серонегативная форма	5	<i>M</i> <i>m</i>	60,9 ^{***} 0,53	8,42 ^{***} 0,31	22,2 0,43	–	–	–
РА, II степень активности	50	<i>M</i> <i>M</i>	37,0 0,85	19,6 ^{***} 0,64	38,4 ^{***} 0,72	36,6 0,13	14,4 0,20	27,2 0,39
Суставная форма	30	<i>M</i> <i>M</i>	39,6 1,19	17,5 ^{***} 0,64	35,3 ^{***} 0,48	–	–	–
Системная форма	20	<i>M</i> <i>M</i>	33,2 ^{***} 0,29	22,7 ^{***} 0,94	43,1 ^{***} 0,95	–	–	–
БПТ	19	<i>M</i> <i>M</i>	34,1 ^{**} 0,57	22,6 ^{***} 0,99	40,9 ^{***} 0,98	–	–	–
МПТ	31	<i>M</i> <i>m</i>	38,9 1,22	17,7 ^{***} 0,65	36,9 ^{***} 0,90	–	–	–
Серопозитивная форма	39	<i>M</i> <i>m</i>	34,5 ^{**} 0,31	20,9 ^{***} 0,67	39,9 ^{***} 0,75	–	–	–
Серонегативная форма	11	<i>M</i> <i>m</i>	46,0 ^{***} 2,06	14,9 [*] 0,63	33,1 ^{***} 0,65	–	–	–
РА, III степень активности	12	<i>M</i> <i>m</i>	24,9 ^{***} 0,56	32,1 ^{***} 0,39	54,7 ^{***} 0,76	32,7 0,67	17,5 0,55	36,4 0,69
Суставная форма	9	<i>M</i> <i>m</i>	25,7 ^{***} 0,51	31,8 ^{***} 0,42	54,0 ^{***} 0,71	–	–	–
Системная форма	3	<i>M</i> <i>m</i>	22,6 ^{***} 0,61	33,2 ^{***} 0,73	56,9 ^{***} 1,86	–	–	–
БПТ	5	<i>M</i> <i>m</i>	24,1 ^{***} 0,42	32,1 ^{***} 0,67	54,9 ^{***} 1,46	–	–	–
МПТ	7	<i>M</i> <i>m</i>	25,5 ^{***} 0,88	32,2 ^{***} 0,52	54,6 ^{***} 0,88	–	–	–
Серопозитивная форма	10	<i>M</i> <i>m</i>	24,3 ^{***} 0,49	32,4 ^{***} 0,42	55,1 ^{***} 0,85	–	–	–
Серонегативная форма	2	<i>M</i> <i>m</i>	27,7 0,90	30,8 0,25	52,9 1,25	–	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению со здоровыми.

Активность АДА, АД и АМФДА в лизатах лимфоцитов здоровых и больных РА в процессе лечения

Контингент	Кол-во больных	Стат. показатели	До лечения			После лечения		
			АДА	АД	АМФДА	АДА	АД	АМФДА
Здоровые	33	<i>M</i> <i>m</i>	45,6 1,07	1,95 0,04	3,19 0,88	—	—	—
РА, I степень активности	15	<i>M</i> <i>m</i>	36,7*** 0,52	1,91 0,02	3,39 0,05	44,3 0,25	1,96 0,01	3,15 0,03
Суставная форма	12	<i>M</i> <i>m</i>	37,1*** 0,61	1,93 0,01	3,33 0,04	—	—	—
Системная форма	3	<i>M</i> <i>m</i>	35,2*** 0,03	1,82 0,03	3,62 0,04	—	—	—
БПТ	3	<i>M</i> <i>m</i>	35,8*** 0,47	1,80 0,01	3,40 0,06	—	—	—
МПТ	12	<i>M</i> <i>m</i>	36,9*** 0,63	1,93 0,01	3,39 0,06	—	—	—
Серопозитивная форма	10	<i>M</i> <i>m</i>	35,6*** 0,22	1,89 0,02	3,44 0,06	—	—	—
Серонегативная форма	5	<i>M</i> <i>m</i>	39,0 0,83	1,93 0,02	3,28 0,04	—	—	—
РА, II степень активности	50	<i>M</i> <i>m</i>	31,4*** 0,28	1,68*** 0,01	3,93*** 0,03	42,3 0,24	1,87 0,01	3,40 0,02
Суставная форма	30	<i>M</i> <i>m</i>	32,6*** 0,16	1,73*** 0,01	3,80*** 0,03	—	—	—
Системная форма	20	<i>M</i> <i>m</i>	29,4*** 0,36	1,60*** 0,01	4,12*** 0,02	—	—	—
БПТ	19	<i>M</i> <i>m</i>	30,3*** 0,42	1,66*** 0,01	4,06*** 0,03	—	—	—
МПТ	31	<i>M</i> <i>m</i>	32,0*** 0,34	1,70*** 0,02	3,85*** 0,04	—	—	—
Серопозитивная форма	39	<i>M</i> <i>m</i>	30,8*** 0,31	1,65*** 0,01	3,99*** 0,03	—	—	—
Серонегативная форма	11	<i>M</i> <i>m</i>	33,2*** 0,19	1,78 0,01	3,70*** 0,06	—	—	—
РА, III ст. активности	12	<i>M</i> <i>m</i>	24,1*** 0,27	1,44*** 0,01	4,46*** 0,06	37,6 0,49	1,76 0,02	3,71 0,04
Суставная форма	9	<i>M</i> <i>m</i>	24,3*** 0,32	1,46*** 0,01	4,45*** 0,08	—	—	—
Системная форма	3	<i>M</i> <i>m</i>	23,4*** 0,27	1,39*** 0,01	4,50*** 0,06	—	—	—
БПТ	5	<i>M</i> <i>m</i>	23,4*** 0,32	1,41*** 0,02	4,42*** 0,03	—	—	—
МПТ	7	<i>M</i> <i>m</i>	24,6*** 0,30	1,46*** 0,01	4,49*** 0,10	—	—	—
Серопозитивная форма	10	<i>M</i> <i>m</i>	23,8*** 0,24	1,43*** 0,01	4,50*** 0,06	—	—	—
Серонегативная форма	2	<i>M</i> <i>m</i>	25,5 0,30	1,49 0,02	4,29 0,05	—	—	—

После окончания курса лечения по сравнению с начальным этапом наблюдалась положительная динамика активности всех энзимов, и отмечалась нормализация активности АДА и АД в эритроцитах, но остались повышенной активностью АМФДА в эритроцитах, лимфоцитах и сниженными активности АДА и АД в лимфоцитах.

Индекс DAS 28 за период стационарного лечения уменьшился на 40,5 % ($p < 0,001$) и составил $2,37 \pm 0,12$ баллов, что соответствует периоду наступающей клинической ремиссии.

При форме с системными поражениями по сравнению с суставной формой в эритроцитах ниже активность АДА ($p < 0,001$), но выше АД ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность АДА, АД и выше АМФДА (все $p < 0,001$).

У больных с БПТ по сравнению с МПТ в эритроцитах ниже активность АДА ($p < 0,01$), выше АМФДА и АД ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность АДА ($p < 0,01$) и выше АМФДА ($p < 0,001$).

При серопозитивной форме РА по сравнению с серонегативной в эритроцитах ниже активность АДА, выше АМФДА и АД (все $p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность АДА, АД и выше АМФДА (все $p < 0,001$).

У больных РА с III степенью активности процесса при поступлении на лечение по сравнению со здоровыми в эритроцитах выше активность АМФДА, АД и ниже АДА, в лимфоцитах ниже активность АДА, АД и выше АМФДА (все $p < 0,001$).

Через 10–12 дней лечения в эритроцитах повысилась ранее сниженная активность АДА ($p < 0,05$), снизились активности АМФДА и АД ($p < 0,001$), в лимфоцитах повысились активности АДА, АД и снизилась активность АМФДА (все $p < 0,001$).

После проведенного курса лечения наблюдалась положительная динамика всех энзимных показателей, но ни один из них не достиг уровня здоровых людей. Индекс DAS 28 снизился на 47,1 % ($p < 0,001$) и составил $3,24 \pm 0,18$ баллов, что соответствует I степени активности ревматоидного процесса.

Сравнительные исследования выявили энзимные различия не только клиническими формами РА, но и между степенями активности патологического процесса. У больных с I степенью активности ревматоидного процесса по сравнению со II степенью в эритроцитах выше активность АДА, но ниже АМФДА и АД (все $p < 0,001$), в лимфоцитах – выше активность АДА, АД и ниже АМФДА (все $p < 0,001$).

При II степени по сравнению с III степенью в эритроцитах выше активность АДА, ниже АД и АМФДА ($p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность АДА, АД и ниже АМФДА ($p < 0,001$).

Таким образом, выявлялась определенная закономерность: чем выше степень активности ревматоидного процесса, тем в эритроцитах ниже активность АДА и выше АД и АМФДА, а в лимфоцитах ниже активность АДА, АД и выше активность АМФДА.

Проведенные нами исследования выявили существенные изменения активности энзимов пуринового метаболизма в клетках крови больных РА. С биохимических позиций можно предположить, что выявленная нами сниженная активность АДА в лимфоцитах может привести к накоплению ее естественного субстрата – аденозина, повышенные концентрации которого ингибируют рибонуклеотид-редуктазу, что повлечет за собой замедление биосинтеза РНК, ДНК, усиленный апоптоз лимфоцитов, нарушения процессов созревания, пролиферации, дифференцировки лимфоцитов и угнетение их функций, в том числе и супрессорных. Кроме того, повышенное содержание аденозина в клетках крови способствует увеличению синтеза фактора некроза опухолей альфа.

На основании полученных данных логично предположить, что нарушения пуринового метаболизма в лимфоцитах могут составить одно из патогенетических звеньев при РА и обусловить иммунные нарушения при этом заболевании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение активности АДА, АД и АМФДА в лизатах лимфоцитов, эритроцитов больных РА в комплексе с клиническими данными способствует выявлению минимальных проявлений активности ревматоидного процесса, разграничению фаз клинической ремиссии и обострения процесса, уточнению степени активности ревматоидного процесса, характера течения заболевания и назначению своевременной адекватной терапии больных РА. Исследования активности АДА, АД и АМФДА в эритроцитах и лимфоцитах в процессе лечения больных РА также способствуют объективизации оценки эффективности проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

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. Карпищенко А. Н. Медицинские лабораторные технологии: Справочник. – СПб.: Интермедика, 2002. – 600 с.
3. Эрдес Ш. Ф., Фоломеева О. М. // Рус. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 20 (220). – С. 1121–1122.