

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЛИЗАТАХ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПОДАГРИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Зборовский А.Б.¹, Бедина С.А.¹, Мозговая Е.Э.¹, Королик О.Д.², Мартемьянов В.Ф.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии», Волгоград, Россия (400138, Волгоград, ул. им. Землячки, 76), e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, Россия (400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1), e-mail: okorolik@yandex.ru.

В лизатах лимфоцитов 48 больных подагрическим артритом определена активность семи ферментов пуринового метаболизма (ПМ): аденозиндезаминазы (АДА), АМФ-дезаминазы (АМФДА), адениндезаминазы (АД), гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ). Проведенные исследования показали, что у больных ПА по сравнению со здоровыми лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГДА и ПНФ, ниже активность АДА, ГФ и ГЗДА. Выявлены существенные изменения активности ферментов, зависящие от клинических особенностей заболевания: формы, тяжести течения, стадии поражения суставов, наличия тофусов и поражения почек. Чем тяжелее течение заболевания, тем в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ и ниже активность АДА, ГЗДА и ГФ. Предложена гипотеза участия ферментов ПМ в патогенезе подагрического артрита.

Ключевые слова: подагрический артрит, аденозиндезаминаза, АМФ-дезаминаза, адениндезаминаза, гуаниндезаминаза, гуанозиндезаминаза, гуанозинфосфорилазопуриннуклеозидфосфорилазы, пуриновый метаболизм.

CLINICAL AND PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF RESEARCH THE ACTIVITY OF ENZYMES OF PURINE METABOLISM IN LYSATES OF LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH GOUTY ARTHRITIS

Zborovskiy A.B.¹, Bedina S.A.¹, Mozgovaya E.E.¹, Korolik O.D.², Martemyanov V.F.¹

¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology» (400138, Volgograd, street Zemlyachki, 76), e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

²The Volgograd State Medical University (400131, Volgograd, Sq. Pavshikh Bortsov, 1), e-mail: okorolik@yandex.ru.

In lysates of lymphocytes of 48 patients with gouty arthritis (PA) to determine the activity of enzymes of purine metabolism seven (PM): Adenosine deaminase (ADA), AMP-deaminase (AMFDA) adenine deaminase (AD), Guanine deaminase (GDA), Guanosine deaminase (GSDA), Purine nucleoside phosphorylase (PNP) and Guanosine phosphorylase (GP). AMFDA, AD, GDA, PNP activities were higher and ADA, GP, GSDA activities were lower in patients with PA in comparison with healthy people. Revealed significant changes in the activity of enzymes that depend on the clinical features of the disease: the form, severity, stage of joint damage, the presence of tophi and kidney damage. The harder the course of the disease, the higher the activity in lymphocytes AMFDA, AD, GDS, PNP and lower activity of ADA, GZDA and GF. Hypothesis of participation of the purine metabolism enzymes in pathogenesis of gouty arthritis was offered.

Keywords: gouty arthritis, Adenosine deaminase, AMP-deaminase, adenine deaminase, Guanine deaminase, Guanosine deaminase, Guanosine phosphorylase, Purine nucleoside phosphorylase, purine metabolism.

За последние 10–20 лет заболеваемость подагрой увеличилась более чем в два раза, и наметилась четкая тенденция к снижению возраста дебюта болезни, а учитывая, что подагрой болеют чаще всего мужчины в социально-активном возрасте, проблемы этиопатогенеза, диагностики и лечения подагры приобретают актуальное медико-социальное значение [1, 2]. Помимо общепризнанных факторов участия в этиопатогенезе подагры генетических факторов, доказана и важная роль нарушений пуринового метаболизма (ПМ) в

патогенетических механизмах подагры, о чем свидетельствует повышенное содержание МК, как конечного продукта ПМ, в крови больных подагрой. К сожалению, из более чем двадцати ферментов, участвующих в регуляции ПМ, известны работы по изучению лишь только трех ферментов в крови больных подагрой: гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, фосфорибозилпирофосфатсинтазы и ксантиноксидазы (КО) [5]. Но эти ферменты функционируют на первых и заключительных этапах ПМ, и мало что известно об активности ферментов, действующих на промежуточных этапах пуринового цикла в крови больных подагрой. Исходя из этого, нами были проведены исследования в лимфоцитах крови больных подагрой 7 ферментов ПМ: аденозиндезаминазы (АДА), АМФ-дезаминазы (АМФДА), адениндезаминазы (АД), гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ).

Цель исследования

Выявление особенностей активности АДА, АМФДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ и ГФ в лизатах лимфоцитов больных подагрическим артритом (ПА) в зависимости от клинических проявлений заболевания.

Материал и методы

Под наблюдением находились 48 больных ПА, из которых 46 (95,8 %) мужчин и 2 (4,2 %) женщины. Диагностика ПА проводилась на основе критериев, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения [10]. Средний возраст больных ($M \pm m$) – $47,5 \pm 0,95$ лет. Длительность болезни составила $6,23 \pm 0,47$ лет. Интермиттирующий ПА (интер. ПА) наблюдался у 19 (39,6 %) больных, хронический (хрон. ПА) – у 29 (60,4 %) больных. Легкое течение болезни у 18 (37,5 %), течение средней тяжести – у 30 (62,5 %) больных, наличие тофусов – у всех больных с хрон. ПА. I стадия поражения суставов выявлена у 19 (39,6 %), II стадия – у 29 (60,4 %) больных, моно-олигоартрит – у 20 (41,7 %) больных. Различные поражения почек наблюдались у 20 (41,7 %) больных, и только у больных с хрон. ПА.

В лечении больных ПА с острым приступом боли применялись внутримышечные инъекции вольтарена (75 мг.), метипреда 4 % – 2,0 мл., дипроспана – 1 мл. В лечении хронического ПА использовались: аллопуринол 100-300 мг., антуран – 0,3-0,4 г., бензобромарон 0,05-0,1 г., алломарон – 1–3 таб. в сутки, мази с нестероидными противовоспалительными средствами, компрессы с 50 % димексидом и анальгином, стол №6.

Лимфоциты из венозной крови выделяли по методике, предложенной Vouyt [7] с использованием лимфосепа с плотностью 1,077-1,079 г/мл. Лизаты лимфоцитов готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания. Активность ферментов определяли по

оригинальным методикам, описанным в работах Девятаевой Н.М. [3] и Кукушкиной Е.В. [4]. Активность ферментов выражали в нмоль/мин/мл., содержащим 1×10^7 клеток (до лизиса). Статистическая обработка данных 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 исследований и их обсуждение

По сравнению со здоровыми у больных ПА в лизатах лимфоцитов при поступлении на лечение (табл. 1) выше активность АМФДА, АД, ГДА и ПНФ, ниже активность АДА, ГФ и ГЗДА (все $p < 0,001$). Если же учитывать не среднестатистические величины активности ферментов, а индивидуальные энзимные показатели, выходящие за пределы условной нормы, рассчитанной по формуле: $M \pm 2\sigma$, то оказалось, что в лимфоцитах за верхние пределы нормы активность АМФДА выходила в 62,5 % случаев, АД – в 72,9 %, ГДА – в 68,8 %, ПНФ – в 64,6 % случаев, за нижние границы – активность АДА – в 85,4 %, ГЗДА – в 20,8 % и ГФ – в 58,3 % случаев. У этих же больных за пределы нормы показатели СОЭ и СРБ выходили в 58,3 % случаев, сиаловых кислот – в 60,4 % случаев.

Через 7–8 дней на фоне некоторого улучшения клинического состояния больных в лизатах лимфоцитов снизилась активность ПНФ ($p < 0,01$), АМФДА, АД, ГДА (все $p < 0,05$), повысились ранее сниженные активности ГФ ($p < 0,001$), АДА и ГЗДА ($p < 0,01$).

По окончании курса стационарного лечения по сравнению с начальным этапом в лимфоцитах снизилась активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ, повысились ранее сниженные активности АДА, ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$). Если же сравнивать энзимные показатели больных перед выпиской из стационара с аналогичными показателями здоровых лиц, то оказалось, что показатели активности АД, ГЗДА и ГФ не имели отличий от здоровых, но активность АДА так и осталась сниженной ($p < 0,001$), а активность ПНФ ($p < 0,001$), ГДА ($p < 0,01$) повышенной. Содержание МК в плазме крови за период стационарного лечения снизилось ($p < 0,001$), но так и осталось повышенным ($p < 0,001$).

У больных с интер. ПА по сравнению с хрон. ПА в лимфоцитах (табл. 1) выше активность АДА, ГЗДА, ГФ, ниже активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ и содержание МК (все $p < 0,001$). И если у больных с интер. ПА за верхние границы нормы выходят показатели активности АМФДА в 10,5 % случаев, АД – в 36,8 %, ГДА и ПНФ – в 21,1 % случаев, а за нижние пределы – активность АДА в 63,2 %, ГФ – в 15,8 % случаев, то у больных с хрон. ПА за верхние границы нормы выходят показатели активности ПНФ в 93,1 % случаев, АМФДА и АД – в 96,6 %, ГДА – в 100 % случаев, за нижние границы – показатели активности ГЗДА в 34,5 %, ГФ – в 86,2% и АДА – в 100 % случаев. Из приведенных данных видно, что изменения активности всех ферментов у больных с хрон. ПА значительно более выражены в

количественном аспекте, чем у больных с интер. ПА. Кроме того, можно отметить, что ни у одного больного с интер. ПА активность ГЗДА не выходит за границы нормы, а у больных с хрон. ПА в 34,5 % случаев активность ГЗДА выходит за нижние пределы нормы, и данный ферментный тест может служить маркером хронизации процесса при подагре.

У больных с моно-олигоартритом по сравнению с больными с полиартритом (табл. 1) выше активность АДА, ГЗДА, ГФ, больше МК, ниже активность АМФДА, АД, ГДА и ПНФ (все $p < 0,001$).

У больных с I стадией поражения суставов по сравнению с больными с II стадией (табл. 1) ниже активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ, содержание МК, выше активность АДА, ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$).

У больных ПА с наличием тофусов по сравнению с больными без тофусов (табл. 1) выше активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ, содержание МК, ниже активность АДА, ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$).

У больных ПА с поражением почек по сравнению с больными без поражения почек (табл. 1) ниже активность АДА, ГЗДА, ГФ, выше активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ и содержание МК (все $p < 0,001$).

У больных ПА с легким течением болезни по сравнению с больными с течением болезни средней тяжести (табл. 1) выше активность АДА, ГЗДА, ГФ, ниже активность ГДА, ПНФ, АМФДА, АД и содержание МК (все $p < 0,001$).

Проведенные исследования показали, что активность изученных ферментов существенно зависит от клинических особенностей заболевания, и по результатам исследований можно выявить некоторые закономерности: наиболее высокие активности АМФДА, АД, ГДА и ПНФ и наиболее низкие активности АДА, ГЗДА и ГФ наблюдаются у больных ПА с хроническим течением, наличием тофусов и поражением почек. Кроме того, анализ индивидуальных энзимных показателей свидетельствует, что величины активности некоторых ферментов могут иметь прогностическое значение: сниженная активность ГЗДА может свидетельствовать о хронизации ПА, а активность (в нмоль/мин/мл) $АДА < 30$, $АД > 2,9$, $ГДА > 14,4$ и $ПНФ > 47,5$ о наличии поражения почек даже при отсутствии клинических проявлений. Период начинающейся клинической ремиссии ассоциируется с нормализацией активности АД, ГЗДА и ГФ.

Таблица 1

Активность ферментов в лизатах лимфоцитов и содержание МК в плазме крови у больных подагрой

Контингент	Стат. показатели	АД А	АМФДА	АД	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ	МК
------------	------------------	---------	-------	----	-----	------	-----	----	----

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 2,06 0,50	11,4 1,35 0,23	Мужчины (16) M=0,376 σ=0,37 m=0,009
									Женщины (19) M=0,293 σ=0,044 m=0,01
Больные ПА, вся группа (48)	М σ m	33,4 4,84 0,70	4,69 1,17 0,17	2,64 0,44 0,06	13,4 1,30 0,19	6,75 0,51 0,07	44,3 4,88 0,70	8,63 0,82 0,12	0,493 0,049 0,007
Интермиттиру ющее течение (19)	М σ m	38,2 3,17 0,73	3,57 0,52 0,12	2,25 0,32 0,07	12,0 0,52 0,12	7,27 0,22 0,05	39,6 2,01 0,46	9,45 0,59 0,14	0,471 0,038 0,009
Хроническое течение (29)	М σ m	30,3 2,66 0,49	5,47 0,75 0,14	2,90 0,29 0,05	14,3 0,67 0,12	6,37 0,39 0,07	47,2 3,68 0,68	8,10 0,38 0,07	0,508 0,050 0,009
Легкое течение (18)	М σ m	38,4 3,11 0,73	3,52 0,51 0,12	2,22 0,29 0,07	12,1 0,68 0,16	7,29 0,20 0,05	39,2 1,66 0,39	9,52 0,53 0,12	0,447 0,035 0,008
Течение средней тяжести (30)	М σ m	30,4 2,71 0,49	5,40 0,83 0,15	2,89 0,30 0,05	14,2 0,81 0,15	6,42 0,33 0,06	47,3 3,41 0,62	8,10 0,36 0,07	0,501 0,031 0,006
Больные ПА с тофусами (29)	М σ m	30,3 2,66 0,49	5,47 0,75 0,14	2,90 0,29 0,05	14,3 0,67 0,12	6,37 0,39 0,07	47,2 3,68 0,68	8,10 0,38 0,07	0,500 0,037 0,007
Больные ПА без тофусов (19)	М σ m	38,2 3,17 0,73	3,57 0,52 0,12	2,25 0,32 0,07	12,0 0,52 0,12	7,27 0,22 0,05	39,6 2,01 0,46	9,45 0,59 0,14	0,453 0,030 0,007
Больные с моно- олигоартритом (20)	М σ m	37,8 3,49 0,78	3,62 0,60 0,13	2,34 0,41 0,09	12,2 0,77 0,17	7,23 0,27 0,06	39,8 2,26 0,51	9,44 0,57 0,13	0,447 0,036 0,008
Больные с полиартритом (28)	М σ m	30,3 2,74 0,52	5,46 0,81 0,15	2,86 0,31 0,06	14,3 0,78 0,15	6,40 0,34 0,06	47,5 3,52 0,67	8,06 0,34 0,06	0,506 0,024 0,005
Больные с поражением почек (20)	М σ m	29,9 2,95 0,66	5,48 0,91 0,20	2,95 0,33 0,07	14,7 0,26 0,06	6,41 0,35 0,08	49,3 2,07 0,46	8,08 0,31 0,07	0,515 0,021 0,005
Больные без поражения почек (28)	М σ m	36,0 4,93 0,82	4,13 0,99 0,19	2,42 0,36 0,07	12,5 0,93 0,18	6,99 0,47 0,09	40,7 2,62 0,50	9,03 0,83 0,16	0,457 0,035 0,007
Больные с I стадий (19)	М σ m	38,3 3,14 0,72	3,43 0,33 0,08	2,23 0,27 0,06	12,0 0,52 0,12	7,28 0,21 0,05	39,6 2,01 0,46	9,47 0,55 0,13	0,453 0,030 0,007
Больные с II стадий (29)	М σ m	30,3 2,62 0,49	5,52 0,65 0,12	2,91 0,29 0,05	14,4 0,63 0,12	6,41 0,33 0,06	47,3 3,55 0,66	8,08 0,36 0,07	0,500 0,037 0,007

С биохимических позиций АДА и ПНФ являются ключевыми ферментами ПМ, обеспечивающими катаболизм пуриновых нуклеозидов: аденозина и гуанозина до конечного продукта – мочевой кислоты, уровень которой повышен в крови больных подагрой [6]. Результаты наших исследований показывают, что у больных ПА в лимфоцитах активность АДА снижена, а ПНФ – повышена, из чего следует, что при катаболизме пуриновых производных преобладает гуанозиновый путь на фоне сниженного аденозинового направления. При дефиците АДА возможно накопление в лимфоцитах его естественного субстрата – аденозина, что по данным литературы может существенно повлиять на функциональные свойства лимфоцитов, нарушить процессы их пролиферации, дифференциации, синтез ДНК, стимулировать активность аденилатциклазы, вести к накоплению циклического аденозинмонофосфата, гиперпродукции опухолевого некротизирующего фактора-альфа и других провоспалительных цитокинов, оказывать цитотоксический эффект на Т-лимфоциты и нарушать процессы иммунной регуляции [8, 9].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что в патогенетических механизмах, помимо общепризнанных генетических факторов, принимают участие как метаболические, так и иммунологические факторы.

В лечении подагры используются ингибиторы КО, препятствующие повышенному образованию МК из ксантина и гипоксантина. Положительный эффект от этих препаратов несомненен, но в случаях их передозировки возможно накопление субстратов КО-реакции: ксантина и гипоксантина и инициировать новую патологию, связанную с накоплением в крови ксантина. Результаты наших исследований свидетельствуют о наличии у больных ПА повышенной активности ГДА и АД и вследствие этого гиперпродукции ксантина и гипоксантина. Исходя из этого, логично предположить новые подходы в лечении ПА, основанные на ингибции активности АД и ГДА, что предотвратит избыточную продукцию ксантина и гипоксантина, и ингибирование активности КО не станет необходимым. Возможны и другие подходы в лечении больных ПА, основанные на снижении скорости катаболических реакций ПМ и ингибции активности ферментов на более ранних этапах пуринового цикла.

Таким образом, результаты проведенных исследований активности ферментов пуринового метаболизма в лизатах лимфоцитов больных ПА расширяют и углубляют наши познания о патогенетических механизмах заболевания и способствуют выработке новых патогенетических подходов в лечении больных ПА.

Выводы

1. В лизатах лимфоцитов больных ПА выявлены существенные изменения активности ферментов ПМ, зависящие от клинических особенностей заболевания.

2. Чем тяжелее течение заболевания, тем в лимфоцитах выше активность АМФДА, АД, ГДА, ПНФ и ниже активность АДА, ГЗДА и ГФ.
3. Исследования активности ферментов в процессе лечения способствуют объективизации оценки эффективности проводимой терапии.
4. Выявленные нарушения энзимной регуляции ПМ способствуют выработке новых альтернативных патогенетических подходов в лечении больных подагрой.

Список литературы

1. Барскова В.Г., Елисеев М.С. Современные принципы диагностики и лечения подагры // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15, № 26. – С. 1984-1986.
2. Болезни суставов: руководство для врачей / под ред. В.И. Мазурова. – СПб.: Спецлит, 2008. – 397 с.
3. 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.
4. Кукушкина Е.В. Клинико-патогенетическое значение исследования активности энзимовгуаниловой ветви пуринового метаболизма в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных ревматоидным артритом: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2010. – 236 с.
5. 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.
6. Стажаров М.Ю. Клинико-патогенетическое значение исследования активности энзимов пуринового метаболизма и антиоксидантной системы крови больных ревматоидным артритом, остеоартрозом и подагрой: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 1998. – 220 с.
7. 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.
8. Kelley W.N. mechanisms of purine overproduction in man // Fortshr. Urol. und Nephrol. – 1980. – Vol. 16. – P. 19-24.
9. Postmatur R., Wang K.K., Nath R., Gildbertsen R.B. A purine nucleoside phosphorylase inhibitor induced apoptosis via caspase-3-like protease activity in MOLT-4 T-cells // Immunopharmacology. – 1997. – Vol. 37. – № 2-3 – P. 19-24.

10. Wallase S.L., Robinson H., Masi A.T. et al. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout // *Arthr. Reum.* – 1977. – Vol. 20. – P. 895.

Рецензенты:

Александров А.В., д.м.н., зав. лабораторией функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБУ «НИИ КиЭР» РАМН, г. Волгоград;

Заводовский Б.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией методов лечения и профилактики заболеваний суставов ФГБУ «НИИ КиЭР» РАМН, г. Волгоград.