

УДК 616-002.77

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЛИЗАТАХ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Мартемьянов В.Ф., Зборовская И.А., Мозговая Е.Э., Стажаров М.Ю., Бедина С.А., Мьякишев М.В., Абрамов Н.В., Карпова О.В., Ермолаева Н.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии» Российской академии медицинских наук, Волгоград, e-mail: mstazharov@yandex.ru

В лизатах эритроцитов 54 больных системной склеродермией (ССД) определяли активность 10-ти ферментов пуринового метаболизма (ПМ): аденозиндеаминазы (АДА), АМФ-деаминазы (АМФДА), адениндеаминазы (АД), гуаниндеаминазы (ГДА), гуанозиндеаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ), гуанозинфосфорилазы (ГФ), 5-нуклеотидазы (5'-НТ), ксантиндегидрогеназы (КДГ), ксантиноксидазы (КО), и 3-х ферментов антиоксидантной системы (АОС): супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП). У больных с I степенью активности патологического процесса по сравнению со здоровыми выше активность АДА, ГФ, КО, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ПНФ, КДГ, СОД, ГП и ГР ($p < 0,01-0,001$). Чем выше активность процесса и острее течение болезни, тем выше активность АМФДА, АД, ГФ и ниже активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ и КДГ. Между всеми степенями активности, вариантами течения и стадиями болезни выявлены существенные энзимные различия. Определение активности ферментов ПМ и АОС в эритроцитах больных ССД способствует уточнению степени активности, характера течения, стадии болезни. Предложена гипотеза об участии ферментов ПМ и АОС в патогенезе ССД.

Ключевые слова: системная склеродермия, пуриновый метаболизм, антиоксидантная система

CLINICAL AND PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF THE PURINE METABOLISM AND ANTIOXIDANT SYSTEM ENZYMES INVESTIGATION IN ERYTHROCYTE LYSATES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLERODERMA

Martemyanov V.F., Zborovskaya I.A., Mozgovaya E.E., Stazharov M.Y., Bedina S.A., Myakishev M.V., Abramov N.B., Karpova O.V., Yermolayeva N.A.

Federal State Budgetary Institution « Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology» under the Russian Academy of Medical Sciences, Volgograd, e-mail: mstazharov@yandex.ru

Adenine deaminase (AD), Adenosine deaminase (ADA), AMP-deaminase (AMPDA), Guanine deaminase (GDA), Guanosine deaminase (GSDA), Guanosine phosphorylase (GP), 5'-nucleotidase (5'-NT), Xanthin dehydrogenase (XDG), Xanthin Oxidase (XO), Purine nucleoside phosphorylase (PNP), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP) activities were determined in erythrocyte lysates of 54 systemic scleroderma (SS) patients. ADA, GP, XO, 5'-NT activities were higher and AMPDA, AD, XDG, PNP, SOD, GR, GP activities were lower in patients with the 1st degree of the pathological process activity in comparison with healthy people ($p < 0,01-0,001$). The increase of the pathological process activity as well as the acute course of the SS was accompanied with the increase of AMPDA, AD, GP activities and the decrease of ADA, GDA, GSDA, PNP, XDG activities. The essential enzyme differences were revealed between all activity degrees, variants and stages of the disease. The definition of the purine metabolism and antioxidant system enzymes activities helps to diagnose the degree of the pathological process activity, character of the course, the stage of the SS and also the proper treatment. Hypothesis of participation of the purine metabolism and antioxidant system enzymes in pathogenesis of SS was offered.

Keywords: systemic scleroderma, purine metabolism, antioxidant system

Системная склеродермия (ССД), или системный склероз, является относительно редким заболеванием (первичная заболеваемость от 3,7 до 20 на млн населения в год), характеризующееся выраженным прогрессирующим течением без четко выраженных фаз клинической ремиссии, множественными висцеральными поражениями, частой и ранней инвалидизацией, достаточно высокой летальностью, что и предопределяет актуальность борьбы с этой нозологией. Учитывая, что ССД сопровождается значительными метаболическими, дистрофическими и иммунными

нарушениями, из которых трудно выделить первичные, нам представляется перспективным направлением изучение активности энзимов пуринового метаболизма (ПМ), в котором преломляются проблемы синтеза белка, нуклеиновых кислот, созревания, пролиферации и дифференциации клеток крови, в том числе и иммунокомпетентных. Кроме того, наличие при ССД воспалительных процессов предполагает участие в них свободнорадикального окисления и, соответственно, ферментов антиоксидантной системы (АОС). Исходя из этого, нами были проведены исследования в эритроцитах

крови больных ССД активности десяти ферментов ПМ: аденозиндезаминазы (АДА), АМФ-дезаминазы (АМФДА), адениндезаминазы (АД), 5'-нуклеотидазы (5'-НТ), гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пурииннуклеозидфосфорилазы (ПНФ), ксантиндегидрогеназы (КДГ), ксантиноксидазы (КО), и трех ферментов АОС: супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР).

Цель исследования – повышение качества диагностики активности патологического процесса при ССД, выявление особенностей энзимной активности эритроцитов в зависимости от клинических особенностей заболевания, выяснение возможности участия ферментов ПМ и АОС в патогенезе.

Материалы и методы исследований

Под наблюдением находились 54 больных ССД, из которых 48 (88,9%) женщин и 6 (11,1%) мужчин. Диагностика ССД проводилась на основании критериев АРА [11]. Средний возраст больных ($M \pm m$) – $43,1 \pm 1,1$ лет, длительность болезни – $8,1 \pm 0,6$ лет. Первая степень активности процесса определялась у 18 (33,3%), II степень – у 29 (53,7%), III степень – у 7 (13%) больных, хроническое течение – у 22 (40,7%), подострое у 27 (50%), острое – у 5 (9,3%) больных. Первая стадия болезни установлена у 18 (33,3%), II – у 36 (66,7%) больных.

Эритроциты выделяли из венозной крови пациентов с использованием 3,8% раствора цитрата натрия с подсчетом количества эритроцитов в 1 мл под микроскопом. Лизаты эритроцитов готовили путем трехкратного замораживания-оттаивания с последующим центрифугированием и удалением клеточных мембран. По оригинальным методикам определяли активность АДА, АМФДА, АД [1], ГДА, ГЗДА, ПНФ, ГФ [4], 5'-НТ, КДГ, КО [5], СОД, ГП, ГР [2]. Активность энзимов выражали в наномоль/мин/мл, содержащим 1×10^9 клеток, активность АОС ферментов – в условных единицах. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение

Статистически значимой зависимости активности ферментов от пола и возраста не было выявлено ($p > 0,05$), что позволило в дальнейшем эти факторы не учитывать. У больных ССД с I степенью активности по сравнению со здоровыми (таблица) в лизатах эритроцитов выше активность АДА, ГФ, КО, 5'-НТ (все $p < 0,001$), ниже активность АД, ПНФ, КДГ, ГР (все $p < 0,001$), АМФДА, СОД, ГП (все $p < 0,01$); у больных с II степенью – выше активность АД, ГФ, 5'-НТ (все $p < 0,001$), АДА, АМФДА (все $p < 0,01$), ниже активность ГДА, ГЗДА, ПНФ, КДГ, СОД, ГР (все $p < 0,001$), ГП ($p < 0,05$); у больных с III степенью выше активность АМФДА, АД, ГФ (все

$p < 0,001$), ниже активность ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, СОД, ГР (все $p < 0,001$) и АДА ($p < 0,01$).

Сравнительные исследования показали, что у больных ССД с I степенью по сравнению с больными с II степенью выше активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ (все $p < 0,001$); по сравнению с больными с III степенью – выше активность АДА, КО, КДГ, 5'-НТ, ГДА, ГЗДА, ПНФ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ (все $p < 0,001$).

У больных с ССД с II степенью по сравнению с больными с III степенью выше активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ (все $p < 0,001$).

В клинической практике вызывает затруднение диагностика обострения болезни, протекающего с минимальной активностью процесса на фоне скудных клинических проявлений, малоизмененных или неизмененных общепринятых острофазовых лабораторных показателей (СОЭ, СРБ и др.). В то же время тактика лечения в фазе клинической ремиссии и обострения даже с минимальной активацией процесса имеет существенные различия, и если фаза обострения своевременно не распознается и не применяется адекватная терапия, то неизбежно прогрессирование патологических изменений в организме больного ускоренными темпами. Нами был проведен сравнительный анализ чувствительности ферментных показателей и острофазовых лабораторных показателей в индикации минимальной активности склеродемического процесса. Результаты исследований показали, что у больных с I (минимальной) степенью активности процесса за верхние референтные пределы здоровых лиц ($M \pm 2G$) выходили показатели активности АДА и КО в 100% случаев, 5'-НТ – в 72,2%, за нижние пределы – показатели ПНФ, ГФ, КДГ – в 100% случаев. Другие энзимные показатели были менее информативны. В то же время у этих же больных за референтные пределы здоровых выходили показатели СРБ, гамма-глобулинов, иммуноглобулинов G, сиаловых кислот, фибриногена в 44,4% случаев, СОЭ, альфа-2-глобулинов, иммуноглобулинов M – в 33,3% случаев, иммуноглобулинов A – в 27,8% и АНФ (+) – в 22,2% случаев, что значительно ниже по информативности отражения минимальной активации процесса, чем вышеуказанные ферментные показатели.

Проведенные исследования выявили некоторые энзимные различия между вариантами течения заболевания. Так, у больных с хроническим течением болезни

по сравнению с больными с подострым течением в эритроцитах выше активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ

(все $p < 0,001$); по сравнению с больными с острым течением выше активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ (все $p < 0,001$).

Активность энзимов в эритроцитах больных ССД

Контингент	Кол-во больных	Стат. показатели	АДА	АМФДА	АД	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ	5'-НТ	КДГ	КО	СОД	ГП	ГР
Здоровые	30	M m	36,7 0,68	21,6 0,85	12,2 0,29	16,9 0,38	11,7 0,51	179,4 3,15	4,72 0,09	40,1 0,96	48,8 0,54	22,3 0,32	40,0 2,6	235,4 9,9	115,3 3,87
I степень активности	18	M m	69,6 2,22	18,3 0,31	10,8 0,13	16,2 0,4	12,1 0,11	64,5 3,43	9,62 0,21	52,7 0,79	34,9 0,63	24,5 0,29	25,3 3,36	181,4 16,6	70,2 8,16
II степень активности	29	M m	40,6 0,97	24,1 0,28	14,0 0,15	11,4 0,38	8,78 0,23	40,1 1,02	12,6 0,24	45,4 0,69	10,6 0,3	24,7 0,43	21,2 2,81	201,3 10,1	61,6 4,87
III степень активности	7	M m	32,3 0,95	30,6 0,86	17,0 0,31	7,18 0,16	5,22 0,3	28,5 0,72	16,3 0,37	38,6 0,89	7,02 0,13	18,3 0,49	18,3 3,22	204,2 9,68	52,3 5,42
Хроническое течение	22	M m	61,4 2,75	20,4 0,82	11,5 0,28	15,4 0,4	11,3 0,26	59,0 3,19	10,1 0,24	51,9 0,79	14,2 0,4	30,3 0,71	20,4 2,5	185,3 16,1	62,6 6,9
Подострое течение	27	M m	42,5 2,5	23,6 0,4	14,1 0,26	10,7 0,37	8,54 0,3	38,8 1,28	12,9 0,29	44,1 0,49	10,2 0,4	24,2 0,61	23,6 2,21	212,8 9,07	57,7 4,46
Острое течение	5	M m	31,2 0,9	31,7 0,72	17,2 0,34	7,06 0,12	4,96 0,19	28,2 0,8	16,6 0,3	38,1 0,89	6,95 0,14	18,0 0,5	22,2 3,07	216,9 8,32	68,2 5,74
I стадия	18	M m	54,1 3,33	21,6 1,01	12,5 0,56	14,5 0,61	11,0 0,42	59,7 4,01	10,5 0,37	50,6 1,46	13,8 0,72	29,8 1,24	24,6 2,72	192,3 8,34	72,4 5,69
II стадия	36	M m	46,7 2,8	23,8 0,69	13,4 0,5	11,2 0,56	8,53 0,39	39,2 1,46	12,9 0,4	45,8 0,81	10,8 0,44	25,0 0,71	20,5 1,86	202,5 7,62	62,5 4,74

У больных с подострым течением по сравнению с больными с острым течением выше активность ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность АМФДА, АД, ГФ (все $p < 0,001$).

II стадия болезни в отличие от I стадии характеризуется множественным поражением внутренних органов, что нашло отражение и в энзимной активности в эритроцитах. Так, у больных с I стадией по сравнению с больными с II стадией выше активность ГДА, ГЗДА, ПНФ, КО, КДГ, 5'-НТ, ниже активность ГФ (все $p < 0,001$).

Таким образом, проведенные исследования выявили существенные изменения активности ферментов ПМ и АОС в эритроцитах больных ССД, зависящие от степени активности процесса, характера течения заболевания и стадии болезни. Установлено, что чем больше степень активности процесса и острее течение заболевания, тем в эритроцитах выше активность АМФДА, АД, ГФ ниже активность АДА, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КДГ.

Выявлены статистически значимые энзимные различия между всеми степенями активности, вариантами течения и стадиями болезни, что способствует уточнению развернутого клинического диагноза и своевременному назначению адекватной терапии.

Однако это заключение относится только к энзимам ПМ – показатели активности ферментов АОС не имеют достоверных энзимных различий между степенями активности, вариантами течения и стадиями

болезни. Но тем не менее активность СОД, ГП и ГР у всех больных ССД была снижена. Одними из ключевых ферментов ПМ являются АДА и ПНФ, играющие ведущую роль в регуляции адениловых и гуаниловых метаболитов. В наших исследованиях установлено значительное снижение активности ПНФ и в меньшей степени АДА по мере увеличения активности склеродермического процесса. Учитывая, что субстратами для АДА и ПНФ-реакций служат аденозин и гуанозин, логично предположить, что при низкой активности этих ферментов в эритроцитах будет происходить накопление гуанозина и аденозина. Эти нуклеозиды являются биологически активными веществами, и повышенное их содержание в клетках крови ведет к блокаде рибонуклеотидредуктазы, угнетению синтеза ДНК, повышению продукции фактора некроза опухоли-альфа, ответственного за регуляцию иммунных процессов, нарушению созревания, пролиферации и дифференциации клеток [3, 6, 7]. При этом могут нарушаться функциональные свойства эритроцитов, транспорт кислорода, уменьшаться оксигенация тканей, что наблюдается при ССД, и способствует дистрофическим изменениям в тканях. Имеются данные о том, что низкая активность АДА в эритроцитах может привести к выраженным иммунным расстройствам [8, 9, 10]. Учитывая, что клетки различных тканей взаимосвязаны общими метаболическими процессами, и изменения этих

процессов в одних клетках тканей не могут не отразиться в других клетках, естественно предположить, что выявленные изменения ПМ и АОС в эритроцитах могут составить некоторые звенья патогенеза ССД. Исходя из этого, можно предположить также, что одной из причин иммунных расстройств могут быть нарушения ПМ, и на основе этого могут быть разработаны новые подходы в лечении, базирующиеся на коррекции ПМ с помощью активаторов или ингибиторов соответствующих ферментов. Однако при этом следует понимать, что изменения активности одних ферментов направлены в сторону выраженного нарушения метаболизма, а других – в сторону сохранения метаболического равновесия, свойственного здоровому организму. То есть, учитывая снижение активности ПНФ и АДА при ССД и повышенное содержание внутриклеточного аденозина и гуанозина, целесообразно использовать активаторы этих энзимов, а для уменьшения продукции аденозина и гуанозина применять ингибиторы 5'-НТ и активаторы АМФ-ДА. Необходимо также учитывать, что при ССД снижена активность антиоксидантных энзимов (СОД, ГП, ГР) и, следовательно, повышена продукция свободных радикалов, которые могут быть причиной снижения активности ПНФ и АДА, и, исходя из этого, добавление в лечебный комплекс антиоксидантных препаратов может также повысить эффективность лечения.

Выводы

1. Определение активности АДА, АМФ-ДА, АД, ГДА, ГЗДА, ПНФ, КДГ, КО и ГФ в лизатах эритроцитов больных ССД способствует уточнению степени активности процесса, характера течения и стадии болезни и своевременному назначению адекватной терапии.
2. Для диагностики минимальной активности склеродермического процесса целесообразно определять в лизатах эритроцитов активность АДА, КО, ПНФ, ГДА и КДГ.
3. Дефицит ПНФ и АДА может служить причиной развития, прогрессирования дистрофических процессов в тканях и инициирования иммунных нарушений.

Список литературы

1. Абрамов Н.Б. Клинико-диагностическое значение исследования активности аденозиндезаминазы, АМФ-дезаминазы и адениндезаминды в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных системной склеродермией: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2009. – С. 45–54.
2. Банникова М.В. Клинико-диагностическое значение показателей ферментов антиоксидантной защиты крови у больных ревматоидным артритом и деформирующим остеоартрозом: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 1992. – С. 77–83.
3. Дмитренко Н.П. Аденозин, его метаболизм и возможные механизмы участия в функции клеток иммунной системы // Успехи современной биологии. – 1984 – Т. 97, № 9. – С. 20–25.
4. Ермолаева Н.А. Клинико-диагностическое исследование активности гуаниндезаминазы, гуанозиндезаминазы,

зы, пуриноклеозидфосфорилазы и гуанозинфосфорилазы в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных системной склеродермией: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2007. – С. 37–48.

5. Карпова О.В. Клинико-диагностическое значение исследования активности 5'-нуклеотидазы, ксантиноксидазы, ксантиндегидрогеназы в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных системной склеродермией: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2007. – С. 32–44.

6. Тогузов Р.Т., Тихонов Ю.В., Талицкий В.В. и др. Метаболизм пуриновых и пиримидиновых производных – основа диагностики патологических состояний в эксперименте и клинике // Вестник АМН СССР. – 1986. – № 8. – С. 40–52.

7. Филановская Л.И., Блинов М.Н. Ферменты обмена пуриновых нуклеотидов как биохимические маркеры дифференцировки нормальных и лейкозных клеток (обзор литературы) // Вопросы медицинской химии. – 1986. – Т. 32, № 6. – С. 10–16.

8. Hirschhorn R. Conversion of human Erythrocyte – Adenosine Deaminase activity to different tissue-specific Isozymes // J. Clin. Invest. – 1975. – Vol. 55. – P. 661–667.

9. Hwang K.C., Wang I.I., Hsien K.H. Increased erythrocyte adenosine deaminase activity in asthmatic children // Acta. Pediatr. Sin. – 1990. – Vol. 31, № 2. – P. 76–80.

10. Korber W., Meisterernst E., Hermann G. Quantitative measurement of Adenosine Deaminase from human erythrocytes // Clin. Chim. Acta. – 1975. – Vol. 63. – P. 323–333.

11. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. /preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma) // Arthr. Rheum. – 1980. – Vol. 23. – P. 581–598.

References

1. Abramov N.B. Kliniko-diagnosticheskoe znachenie issledovanie aktivnosti adenoindezaminazy, AMF-dezaminazy i adenindezaminidy v lizatah limfocitov, jericitocitov i plazme krovi bol'nyh sistemoj sklerodermiej: dis....kand. med. nauk. Volgograd, 2009. pp. 45–54.

2. Bannikova M.V. Kliniko-diagnosticheskoe znachenie pokazatelej fermentov antioksidantnoj zashhity krovi u bol'nyh revmatoidnym artritom i deformirujushhim osteoartrozom: dis.... kand. med. nauk. Volgograd, 1992. pp. 77–83.

3. Dmitrenko N.P. Adenozin, ego metabolizm i vozmozhnye mehanizmy uchastija v funkcii kletok immunoj sistemy // Uspeshi sovremennoj biologii. 1984 T.97, no. 9. pp. 20–25.

4. Ermolaeva N.A. Kliniko-diagnosticheskoe issledovanie aktivnosti guanindezaminazy, guanozindezaminazy, purinnukleozidfosforilazy i guanozinfosforilazy v lizatah limfocitov, jericitocitov i plazme krovi bol'nyh sistemoj sklerodermiej: dis.... kand. med. nauk. Volgograd, 2007. pp. 37–48.

5. Karpova O.V. Kliniko-diagnosticheskoe znachenie issledovaniya aktivnosti 5'-nukleotidazy, ksanтиноксидазы, kсантиндегидрогеназы в лизатах лимфоцитов, jericitocitov i plazme krovi bol'nyh sistemoj sklerodermiej: dis.... kand. med. nauk. Volgograd, 2007. pp. 32–44.

6. Toguzov R.T., Tihonov Ju.V., Talickij V.V. i dr. Metabolizm purinovyh i pirimidinovyh proizvodnyh osnova diagnostiki patologicheskikh sostojanij v jeksperimente i klinike // Vestnik AMN SSSR. 1986. no. 8. pp. 40–52.

7. Filanovskaja L.I., Blinov M.N. Fermenty obmena purinovyh nukleotidov kak biohimicheskie markery differencirovki normal'nyh i lejkoznyh kletok (obzor literatury) // Voprosy medicinskoj himii. 1986. T.32, no. 6. pp. 10–16.

8. Hirschhorn R. J. Clin. Invest, 1975, Vol. 55, pp. 661.

9. Hwang K.C., Wang I.I., Hsien K.H. Acta. Pediatr. Sin, 1990, Vol.31, no. 2, pp. 76.

10. Korber W., Meisterernst E., Hermann G. Clin. Chim. Acta, 1975, Vol. 63, pp. 323.

11. Arthr. Rheum. , 1980, Vol. 23, pp. 581.

Рецензенты:

Шилова Л.Н., д.м.н., зав. кафедрой госпитальной терапии, ВПТ с курсом клинической ревматологии, ФУВ ГОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава», г. Волгоград;

Лемперт Б.А., д.м.н., заслуженный врач РФ, зам. главного врача ГУЗ «Городская клиническая больница № 3», г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 18.10.2013.