

К исследованию активности энзимов гуаниловой ветви пуринового метаболизма в периферической крови больных ревматоидным артритом

Е.В. Кукушкина, Е.Э. Мозговая, *А.И. Романов

Учреждение Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии РАМН», Волгоград;
*ФГУ «Центр реабилитации» УД Президента РФ

В лизатах лимфоцитов и эритроцитов крови 80 больных ревматоидным артритом (РА) определялись активности гуаниндеаминазы (ГДА), гуанозиндеаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ), гуанозинфосфорилазы (ГФ) при поступлении в стационар, через 8–10 дней и по окончании курса лечения. Показано, что у больных РА, по сравнению со здоровыми, в эритроцитах выше активность ГДА, ГФ, ПНФ, в лимфоцитах выше активность ГЗДА, ГФ, ниже активность ГДА и ПНФ. Исследования активности энзимов способствовали уточнению степени активности патологического процесса и объективизации оценки эффективности терапии больных РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, гуаниндеаминаза, гуанозиндеаминаза, гуанозинфосфорилаза, пуриннуклеозидфосфорилаза.

The activity of guanine deaminase (GDA), guanosine deaminase (GSDA), purine nucleoside phosphorilase (PNP), guanosine phosphorilase (GP) in lymphocyte and erythrocyte lysates of peripheral blood was studied in 80 patients with rheumatoid arthritis (RA) upon admission in hospital, after 8–10 days of treatment and on completion of inpatient care course. The GDA, GP, PNP activity was increased in erythrocyte lysates, the GSDA, GP, activity was increased in lymphocytes, the GDA, PNP activity was reduced in lymphocytes in patients with RA. 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: rheumatoid arthritis, guanine deaminase, guanosine deaminase, guanosine phosphorilase, purine nucleoside phosphorilase.

Введение. Ревматоидный артрит (РА) занимает особое место среди ревматических заболеваний, и, хотя его распространенность относительно небольшая (от 0,5 до 1,5%), он считается одним из самых тяжелых заболеваний суставов. Медико-социальная значимость РА обусловлена его неуклонно прогрессирующим течением, быстро приводящим к нарушению функций суставов, их анкилозированию, значительному ухудшению качества жизни, длительной и стойкой потере трудоспособности, ранней инвалидизации, сокращению продолжительности жизни на 5–10 лет, выраженными экономическими затратами на лечение [3].

Цель работы. Повышение качества диагностики активности патологического процесса при РА, объективизации контроля эффективности проводимой терапии с использованием показателей активности гуаниндеаминазы (ГДА), гуанозиндеаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ), гуанозинфосфорилазы (ГФ), выяснение роли этих энзимов в патогенезе РА.

Методика исследования

В условиях стационара наблюдали 80 больных РА: 57 (71,3%) женщин, 23 (28,7%) мужчин. Средний возраст больных ($M \pm \sigma$) — $42,5 \pm 8,1$ лет, длительность болезни — $8,53 \pm 2,96$ лет. Первая степень активности патологического процесса установлена у 16 (20%), II степень — у 50 (62,5%), III степень — у 14 (17,5%) больных. Серопозитивная форма РА отмечалась у 61 (76,3%), форма с системными поражениями — у 27 (33,8%), суставная форма — у 53 (66,2%), быстропрогрессирующее течение (БПТ) — у 28 (35%), прогрессирующее течение (ПТ) — у 52 (65%)

больных. Первая рентгенологическая стадия поражения суставов определялась у 8 (10%), II стадия — у 41 (51,3%), III стадия — у 24 (30%), IV стадия — у 7 (8,8%) больных. Функциональный класс (ФК) 2 степени (ФК-2) установлен у 35 (43,8%), ФК-3 — у 38 (47,5%), ФК-4 — у 7 (8,8%) больных. Контрольную группу составили 30 практически здоровых людей.

Лимфоциты и эритроциты выделяли из венозной крови с использованием Lymph separation medium фирмы «ICN Biomedical» [2]. Лизаты клеток готовили путем замораживания-оттаивания, центрифугирования. Активность ГДА, ГЗДА определяли фенолгипохлоритным методом по азоту, ГФ — по приросту содержания гуанина, ПНФ — кинетическим методом [1]. Активность энзимов рассчитывали для лимфоцитов на 1 мл, содержащий до лизиса $1 \cdot 10^7$ клеток, для эритроцитов — $1 \cdot 10^8$ клеток, выражали в нмоль/мин/мл.

У всех больных определяли общий белок, белковые фракции, общий анализ крови и мочи, сиаловые кислоты, фибриноген, С-реактивный белок (СРБ), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), ревматоидный фактор (РФ), антинуклеарный фактор (АНФ), иммуноглобулины А, М, G.

Лечение больных РА проводилось в соответствии с действующими клиническими рекомендациями: базисные препараты, нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды (преимущественно местно), физиотерапевтические воздействия, лечебная физкультура.

При обработке данных пользовались программным пакетом «Statistica 6,0». Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Активность энзимов в лимфатах лимфоцитов у больных РА

Контингент	Кол-во	Стат. показатели	ГДА	ГЗДА	ГФ	ПНФ
Здоровые	30	М σ m Me квартили	11,13 0,86 0,16 11,2 10,5–11,6	7,65 0,76 0,14 7,45 7,0–8,3	11,47 1,45 0,26 11,8 10,3–12,5	34,9 3,39 0,62 35,4 32,3–36,4
Больные РА (I степень активности) поступление	16	М σ m Me Квартили	14,6 1,43 0,36 15,1 13,6–15,6	6,91 1,07 0,27 6,80 6,2–7,9	19,0 1,88 0,47 18,9 17,8–20,6	44,8 2,15 0,54 45,7 44,1–46,4
Больные РА (I степень активности) выписка	16	М σ m Me Квартили	11,9 0,42 0,10 11,8 11,6–12,1	7,61 0,13 0,03 7,60 7,5–7,7	12,7 0,59 0,15 12,55 12,2–13,3	35,7 0,51 0,13 35,5 35,3–36,0
Больные РА (II степень активности) поступление	50	М σ m Me Квартили	8,21 1,31 0,19 8,20 7,0–9,0	9,96 0,99 0,14 9,95 9,2–10,7	13,0 1,16 0,16 12,9 12,0–13,7	29,7 1,86 0,26 29,8 28,4–31,3
Больные РА (II степень активности) выписка	50	М σ m Me Квартили	10,8 0,68 0,10 10,9 10,3–11,2	7,67 0,32 0,04 7,60 7,4–8,0	12,0 0,37 0,05 12,0 11,6–12,2	36,2 1,72 0,24 36,45 34,7–37,7
Больные РА (III степень активности) поступление	14	М σ m Me Квартили	5,54 0,51 0,14 5,55 5,2–5,9	12,9 0,77 0,20 12,85 12,3–13,6	9,4 0,98 0,26 9,35 8,8–10,1	21,0 1,46 0,39 21,0 19,6–22,4
Больные РА (III степень активности) выписка	14	М σ m Me Квартили	9,73 0,29 0,08 9,75 9,6–9,9	8,59 0,42 0,11 8,45 8,3–8,7	30,1 1,14 0,30 30,05 29,3–31,2	11,7 0,59 0,16 11,9 11,2–12,2
Больные РА с системными поражениями поступление	27	М σ m Me Квартили	7,39 2,36 0,45 6,80 6,3–7,1	10,9 1,76 0,34 11,0 10,1–11,8	11,9 2,41 0,46 11,8 11,4–12,2	29,0 8,12 1,56 27,5 26,6–28,6
Больные РА, суставная форма поступление	53	М σ m Me Квартили	9,85 3,31 0,45 8,80 8,0–11,3	9,32 2,04 0,28 9,20 8,6–10,3	14,4 3,40 0,47 13,6 12,8–15,9	32,3 7,46 1,03 31,2 29,3–32,6

У больных РА (всей группы) при поступлении на лечение, по сравнению со здоровыми, в лимфатах эритроцитов были выше активности ГДА, ГФ, ПНФ (все $p < 0,001$), в лимфатах лимфоцитов выше активность ГЗДА ($p < 0,001$), ГФ ($p = 0,004$), ниже ГДА ($p < 0,001$) и ПНФ ($p = 0,036$). Через 8–10 дней в эритроцитах снизилась активность ГФ (все $p < 0,001$), ПНФ ($p = 0,049$), в лимфоцитах снизилась активность ГЗДА ($p = 0,042$). После проведенного курса лечения наблюдалась положительная динамика всех энзимных показателей: в эритроцитах снизились активности ГДА, ПНФ, ГФ (все $p < 0,001$), в лимфоцитах повысилась активность ГДА, ПНФ, снизилась активность ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$) (табл. 1, 2).

Выявлены энзимные различия между степенями активности ревматоидного процесса. У больных РА с I степенью активности, по сравнению со II степенью, в эритроцитах ниже активность ГДА, ПНФ, ГФ и выше ГЗДА (все $p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ГФ и ниже ГЗДА (все $p < 0,001$); по сравнению с III степенью, в эритроцитах выше активность ГДА, ПНФ, ниже ГФ и ГЗДА (все $p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ГФ и ниже ГЗДА (все $p < 0,001$). При II степени, по сравнению с III степенью, в эритроцитах ниже активность ГЗДА, ГФ, выше ГДА и ПНФ (все $p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ГФ и ниже ГЗДА (все $p < 0,001$).

У больных РА с системными поражениями, по сравнению с больными с суставной формой РА, в эритроцитах выше активность ГФ ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность ГДА ($p < 0,001$), ГФ ($p = 0,003$), выше ГЗДА ($p < 0,001$). У больных РА с БПТ, по сравнению с больными ПТ, в эритроцитах выше активность ГЗДА ($p = 0,036$), ГФ ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность ГДА, ПНФ, ГФ и выше ГЗДА (все $p < 0,001$). У больных с серопозитивной формой РА, по сравнению с серонегативной формой, в эритроцитах выше активность ГФ ($p = 0,005$), в лимфоцитах ниже активность ГФ ($p = 0,006$) и выше ГЗДА ($p = 0,004$).

У больных РА с I стадией, по сравнению со II стадией, в эритроцитах ниже активность ГФ ($p = 0,041$), в лимфоцитах выше активность ГДА ($p = 0,006$), ПНФ ($p = 0,005$) и ГФ ($p = 0,005$); по сравнению с III стадией, в эритроцитах ниже активность ГФ ($p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА ($p < 0,001$), ПНФ ($p = 0,006$), ГФ ($p < 0,001$) и ниже ГЗДА ($p < 0,001$); по сравнению с IV стадией, в эритроцитах ниже активность ГДА ($p = 0,004$),

ПНФ ($p = 0,003$), ГФ ($p < 0,001$) и выше ГЗДА ($p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА ($p = 0,043$), ПНФ ($p = 0,044$), ГФ ($p < 0,001$) и ниже ГЗДА ($p < 0,001$). При II стадии, по сравнению с III стадией, в эритроцитах ниже активность ГФ ($p = 0,043$), в лимфоцитах выше активность ГДА ($p = 0,041$), ГФ ($p = 0,042$) и ниже ГЗДА ($p = 0,006$); по сравнению с IV стадией, в эритроцитах ниже активность ГДА ($p = 0,038$), в лимфоцитах статистически значимых различий нет. При III стадии, по сравнению с IV стадией, в обеих средах статистически значимых энзимных различий не выявлено.

У больных РА с ФК-2, по сравнению с ФК-3, в эритроцитах ниже активность ГЗДА ($p = 0,044$) и ГФ ($p < 0,001$), в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ГФ и ниже ГЗДА (все $p < 0,001$); по сравнению с ФК-4, в эритроцитах ниже активность ГФ ($p < 0,001$), в лимфоцитах ниже активность ГЗДА ($p < 0,001$), выше ПНФ

Таблица 2

Активность энзимов в лизатах эритроцитов у больных РА

Контингент	Кол-во	Стат. показатели	ГДА	ГЗДА	ГФ	ПНФ
Здоровые	30	М σ m Me квартили	17,0 1,92 0,35 16,95 15,6–19,2	11,2 0,89 0,16 10,95 10,5–11,8	4,82 0,50 0,09 4,85 4,4–5,3	179,6 18,12 3,31 179,5 166–195
Больные РА (I степень активности)	16	М σ m Me Квартили	21,1 3,33 0,83 21,15 18,5–21,5	10,1 0,39 0,10 10,15 9,9–10,4	5,44 0,38 0,10 5,45 5,2–5,7	221,2 7,36 1,84 219,5 218–225
Больные РА (I степень активности)	16	М σ m Me Квартили	17,4 0,86 0,22 17,25 16,7–18,0	11,2 0,14 0,04 11,15 11,05–11,3	4,79 0,17 0,04 4,80 4,7–4,9	185,4 5,98 1,49 185,5 182–190
Больные РА (II степень активности)	50	М σ m Me Квартили	27,5 2,57 0,36 27,2 25,4–29,4	8,28 0,77 0,11 8,25 7,6–9,0	6,22 0,52 0,07 6,20 5,8–6,6	232,4 7,49 1,06 232,5 226–238
Больные РА (II степень активности)	50	М σ m Me Квартили	24,74 2,14 0,30 24,75 23,1–26,5	8,79 0,69 0,10 8,75 8,2–9,5	5,87 0,44 0,06 5,80 5,5–6,3	218,0 5,58 0,79 217,5 214–222
Больные РА (III степень активности)	14	М σ m Me Квартили	12,9 0,78 0,21 12,9 12,6–13,3	19,9 1,88 0,50 20,3 18,6–21,4	7,23 0,39 0,10 7,25 6,9–7,5	145,2 11,88 3,17 140,0 137–158
Больные РА (III степень активности)	14	М σ m Me Квартили	19,5 1,89 0,50 19,95 18,6–20,8	12,99 0,76 0,20 13,1 12,7–13,6	5,25 0,20 0,05 5,30 5,1–5,3	175,7 6,5 1,74 174,7 170–180
Больные РА с системными поражениями	27	М σ m Me Квартили	25,3 7,20 1,39 27,9 21,5–30,3	10,6 5,35 1,05 8,05 7,7–9,7	6,56 0,58 0,11 6,60 6,0–7,0	219,2 40,4 7,78 238,0 230–242
Больные РА, суставная форма	53	М σ m Me Квартили	22,6 5,19 0,71 24,5 18,5–26,1	10,7 3,96 0,54 9,30 8,6–10,3	6,08 0,74 0,10 6,00 5,5–6,6	212,7 29,8 4,09 222,0 218–230

($p=0,045$) и ГФ ($p=0,039$). У больных РА с ФК-3, по сравнению с ФК-4, в обеих исследуемых средах статистически значимых энзимных различий не определялось.

Таким образом, проведенные исследования выявили существенные изменения активности энзимов пуринового метаболизма в клетках крови больных РА, зависящие от степени активности патологического процесса, характера течения болезни, клинико-анатомической формы, наличия РФ, ФК, стадии поражения суставов. Дефицит ПНФ в лимфоцитах, особенно выраженный при II–III степени активности процесса, влечет за собой

избыточное накопление гуанозина, который является мощным ингибитором рибонуклеотидредуктазы, что ведет к снижению синтеза ДНК, преимущественно в Т-лимфоцитах, нарушению процессов их созревания, дифференциации, частичной потере ими супрессорного воздействия на В-лимфоциты. Выявленные изменения энзимной активности в лимфоцитах могут быть причиной иммунных нарушений при РА и составить один из патогенетических механизмов этого заболевания.

Заключение

Наиболее информативными в отражении минимальной активности ревматоидного процесса оказались: в эритроцитах — показатели активности ПНФ, в лимфоцитах — ГДА, ПНФ и ГФ, которые выходили за референтные пределы здоровых лиц в 87,5–100% случаев. Выявлены энзимные различия крови между всеми степенями активности ревматоидного процесса, вариантами течения болезни, что способствует уточнению диагноза и назначению адекватной терапии. Исследования активности энзимов в процессе лечения больных РА способствуют объективизации оценки эффективности проводимой терапии. Выявленные изменения активности изученных энзимов в лимфоцитах могут вызвать существенные изменения функциональных свойств лимфоцитов и инициировать иммунные расстройства при РА.

Литература

1. Ермолаева Н.А. Клинико-диагностическое значение исследования активности гуаниндексаминазы, гуанозиндезаминазы, пуриннуклеозидфосфорилазы и гуанозинфосфорилазы в лизатах лимфоцитов, эритроцитов и плазме крови больных системной склеродермией: дис.... канд. мед. наук. — Волгоград. — 2007. — 187 с.
2. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. — Санкт-Петербург: Интермедика. — 2002. — Том 2. — 600 с.
3. Эрдес Ш.Ф., Фоломеева О.М. // Рус. мед. журн. — 2004. — Т. 12, № 20 (220). — С. 1121–1122.