

Клинико-патогенетическое значение исследования активности ферментов пуринового метаболизма в лизатах лимфоцитов и плазме крови больных реактивным артритом

Е.В. Евдокимова², А.И. Романов¹, В.Ф. Мартемьянов²,
Е.Э. Мозговая², М.Ю. Стажаров², С.А. Бедина²

¹ФГБУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии» РАМН, Волгоград,

²ФГБУ «Центр реабилитации» УД Президента РФ

В лизатах лимфоцитов и плазме крови 54 больных реактивным артритом (РеА) в процессе лечения была изучена активность четырех энзимов пуринового метаболизма: гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ). Показано, что у больных РеА в плазме повышена активность ГДА, ПНФ и снижена активность ГЗДА и ГФ. Выявлена зависимость активности ферментов от характера течения болезни: чем острее течение заболевания, тем в плазме выше активность ГДА, ГЗДА, ГФ и ниже ПНФ, в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ниже ГЗДА и ГФ. У больных с урогенным РеА по сравнению с больными энтерогенным РеА в лимфоцитах ниже активность ГДА, ПНФ, выше активность ГЗДА и ГФ, в плазме существенных энзимных различий не выявлено. Изученные энзимные показатели способствуют уточнению диагноза и объективизации оценки эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: реактивный артрит, ферменты пуринового метаболизма.

The activity of four enzymes of purine metabolism has been studied in 54 patients suffering of reactive arthritis (RA): guanindezaminase (GDA), guanozindezaminase (GZDA), purine nucleoside phosphorylase (PNP) and guanozinphosphorilase (GP). It was found out that in the plasma of patients with RA there is an increased activity of GDA, PNP while GZDA and GP activity is decreased. A correlation between the enzymatic activity and the course of the disease was found as well: the more acute is the course, the more active are GDA, GZDA, GP and less active is PNP in plasma; in lymphocytes GDA and PNP activity is higher, while GZDA and GP activity is less. If to compare patients with urogenic RA and enterogenic RA one can see less activity of GDA and PNP and better activity of GZDA and GP in lymphocytes of patients with urogenic RA. There were no any considerable enzymatic difference in plasma. The studied enzymatic parameters promote better diagnostics as well as better objective assessment of the effectiveness of the therapy prescribed.

Key words: reactive arthritis, enzymes of purine metabolism.

Под реактивными артритами (РеА) понимают ревматические заболевания суставов, развивающиеся в течение 2–6 нед после перенесенных мочеполовых или кишечных инфекций. Различают урогенный РеА, вызванный хламидиями в урогенитальном тракте, и энтерогенный, обусловленный преимущественно иерсиниозной инфекцией в желудочно-кишечном тракте [1, 7]. Заболеваемость РеА составляет от 4 до 6 случаев на 100 000 населения [2, 4, 9].

Ведущими теориями патогенеза являются иммунологические, основанные на развитии иммунных реакций на инфекционные агенты, и генетические, связанные с наличием у лиц, предрасположенных к РеА, антигена HLA-B27. Учитывая, что одним из ведущих звеньев иммуногенеза являются лимфоциты и нарушения метаболизма, особенно пуринового, в них могут приводить к дискоординации иммунных процессов [3, 5], нам представляется перспективным и актуальным направление по изучению активности энзимов.

Цель исследования – изучить активность гуаниндезаминазы (ГДА), гуанозиндезаминазы (ГЗДА), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ) и гуанозинфосфорилазы (ГФ) в лизатах лимфоцитов и плазме крови больных РеА в зависимости от клинических особенностей заболевания, выявить

энзимные различия между урогенным и энтерогенным РеА, оценить возможность использования энзимных показателей в качестве критериев эффективности проводимой терапии больных РеА.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 54 больных РеА, из которых 36 (66,7%) мужчин и 18 (33,3%) женщин. Диагноз РеА устанавливался в соответствии с диагностическими критериями, принятыми на IV Международном совещании по РеА в Берлине, и с учетом Российских критериев РеА [1, 7]. Возраст больных варьировал от 18 до 47 лет, в среднем ($M \pm m$) составил $31,9 \pm 1,0$ года. Длительность болезни варьировала от 1 до 25 мес, в среднем составила $9,39 \pm 0,85$ мес. С острым течением (длительность болезни до 6 мес) было 20 (37%) больных, из них 14 (70%) мужчин и 6 (30%) женщин. Средний возраст всех больных $30,1 \pm 1,6$ года. Длительность болезни $3,65 \pm 0,37$ мес. Группу с затяжным течением с длительностью болезни от 6 до 12 мес составили 19 (35,2%) больных: 13 (68,4%) мужчин и 6 (31,6%) женщин. Возраст всех больных $29,6 \pm 1,6$ года. Длительность болезни $9,8 \pm 0,8$ мес. Хроническое течение было у 15 (27,8%) больных: 9 (60%) мужчин и 6 (40%) женщин. Возраст больных всей группы $37,2 \pm 1,9$ года. Длительность болезни $17,9 \pm 1,0$ мес.

I степень активности процесса установлена у 21 (38,9%) больного, II степень — у 22 (40,7%) и III степень — у 11 (20,4%) больных. I стадия поражения суставов определена у 28 (51,9%) больных, II стадия — у 10 (18,5%) и стадия 0 — у 16 (29,6%) больных. I Функциональный класс суставов (ФК-I) установлен у 14 (25,9%) больных, ФК-II — у 29 (53,7%) и ФК-III — у 11 (20,4%) больных. Группу с урогенным РеА составили 30 больных, из них 8 (26,7%) женщин и 22 (73,3%) мужчины. Возраст больных $27,0 \pm 0,96$ года, длительность болезни $9,27 \pm 1,3$ мес. У всех больных в соскобах слизистых уретры, шейки матки или сыворотке крови обнаружены повышенные титры антител к *Chlamydia trachomatis*. В группу с энтерогенным РеА вошли 24 больных, из них 14 (58,3%) мужчин и 10 (41,7%) женщин. Возраст больных колебался от 27 до 47 лет, средний возраст составил $38,1 \pm 1,1$ года, длительность болезни — от 1 до 20 мес, средняя — $9,33 \pm 1,2$ мес. У всех больных в сыворотке крови выявлены повышенные титры антител к *Yersinia enterocolitica*.

Выделение лимфоцитов из венозной крови проводили по методике Boyum [6]. Активности ГДА и ГЗДА определяли методом W.T. Saraway [8] с оценкой аммиака, активность ПНФ — спектрофотометрически по содержанию мочевой кислоты [10], активность ГФ — по концентрации гуанина [11]. Активность энзимов в лизатах лимфоцитов выражали в нмоль/мин/мл, исходя из содержания в 1 мл (до лизиса) 10^7 клеток, в плазме — в нмоль/мин/мл.

Определение *Chlamydia trachomatis* проводили с использованием иммуноферментного анализа в соскобах слизистых уретры, шейки матки, сыворотке крови с определением антител класса иммуноглобулинов G, A и M к хламидиям. Пограничными титрами считались: IgM и A — 1:50, IgG — 1:100.

Материалом для определения *Yersinia enterocolitica* были кал с использованием бактериологического посева (референс-значение «не обнаружено») и сыворотка крови с определением антител в реакции непрямой гемагглютинации. Пограничное значение — титр 1:200. Также проводили общий анализ крови, мочи, определяли С-реактивный белок, ревматоидный фактор, иммуноглобулины A, M и G, HIA-B27.

В лечении больных РеА использовали комплексную терапию, включающую антибактериальные препараты: сумамед, эритромицин, ципролет с длительностью приема не менее 4 нед и нестероидные противовоспалительные препараты: диклофенак, кетопрофен, мелоксикам, найз.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Статистика 6.0 с помощью параметрических и непараметрических методов вариационной статистики. Для сравнения зависимых групп применяли критерий Вилкоксона, независимых групп — критерий Манна-Уитни. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При поступлении на лечение у больных РеА (всей группы) по сравнению со здоровыми (табл. 1) в плазме была выше активность ГДА, ПНФ, ниже активность ГЗДА и ГФ, в лизатах лимфоцитов статистически значимых различий не отмечалось.

У больных РеА с острым течением заболевания по сравнению со здоровыми в плазме (табл. 2) при поступлении выше активность ГДА, ПНФ, ниже активность ГЗДА и ГФ, в лизатах лимфоцитов (табл. 3) выше активность ГДА, ПНФ, ниже ГЗДА и ГФ.

Через 7–8 дней лечения в плазме снизилась активность ГДА ($p < 0,01$), ПНФ ($p < 0,001$), повысилась ранее сниженная активность ГЗДА ($p < 0,001$) и ГФ ($p < 0,05$), в лимфоцитах наметилась тенденция к снижению активности ГДА, ПНФ и повышению активности ГЗДА и ГФ (все $p > 0,05$).

По окончании лечения в плазме и лимфоцитах снизилась активность ГДА, ПНФ, повысилась ранее сниженная активность ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$) и все энзимные показатели не отличались от таковых у здоровых ($p > 0,05$).

Таблица 1
Активность энзимов в плазме крови и лизатах лимфоцитов больных урогенным и энтерогенным РеА

Контингент	Количество больных	Статистические показатели	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ
Плазма						
Больные РеА (вся группа)	54	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,30*** 0,10 0,01	1,90*** 0,10 0,01	1,00*** 0,09 0,01	1,02*** 0,08 0,01
Больные с энтерогенным РеА	24	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,32*** 0,10 0,02	1,89** 0,10 0,02	1,01*** 0,09 0,02	1,00*** 0,05 0,01
Больные с урогенным РеА	30	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,28*** 0,10 0,02	1,91** 0,10 0,02	0,99*** 0,09 0,02	1,04 0,09 0,02
Лимфоциты						
Больные РеА (вся группа)	54	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,7 1,12 0,15	8,10 2,41 0,33	33,9 4,48 0,61	12,2 2,17 0,30
Больные с энтерогенным РеА	24	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	12,4** 0,81 0,17	6,54*** 1,01 0,21	36,7* 3,34 0,68	10,9 1,45 0,30
Больные с урогенным РеА	30	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,1* 0,99 0,18	9,35*** 2,49 0,45	31,6** 3,98 0,73	13,2*** 2,13 0,39

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ — статистически значимые различия по отношению к здоровым.

Таблица 2

Активность энзимов в плазме крови больных РеА с различным характером течения в процессе лечения

Контингент	Количество больных	Статистические показатели	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ
Больные РеА с острым течением, при поступлении	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,39*** 0,07 0,02	1,81*** 0,07 0,01	1,08*** 0,06 0,01	0,99*** 0,06 0,01
Больные РеА с острым течением, через 7-8 дней лечения	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,32 0,05 0,01	1,88 0,06 0,01	1,02 0,05 0,01	1,01 0,04 0,01
Больные РеА с острым течением, перед выпиской	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,19 0,04 0,01	2,01 0,05 0,01	0,89 0,04 0,01	1,09 0,03 0,01
Больные РеА с затяжным течением, при поступлении	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,28*** 0,06 0,01	1,91* 0,07 0,02	0,97*** 0,06 0,01	1,02* 0,05 0,01
Больные РеА с затяжным течением, через 7-8 дней лечения	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,25 0,05 0,01	1,94 0,07 0,02	0,94 0,05 0,01	1,04 0,04 0,01
Больные РеА с затяжным течением, перед выпиской	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,19 0,03 0,01	2,03 0,04 0,01	0,92 0,22 0,05	1,09 0,04 0,01
Больные РеА с хроническим течением, при поступлении	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,20 0,04 0,01	2,00 0,08 0,02	0,93* 0,07 0,02	1,06 0,09 0,02
Больные РеА с хроническим течением, через 7-8 дней лечения	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,19 0,03 0,1	2,01 0,06 0,02	0,92 0,06 0,02	1,06 0,08 0,02
Больные РеА с хроническим течением, перед выпиской	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,16 0,02 0,00	2,07 0,04 0,01	0,87 0,03 0,01	1,09 0,02 0,01
Здоровые	30	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	1,16 0,13 0,02	2,08 0,29 0,05	0,85 0,09 0,02	1,09 0,12 0,02

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по отношению к здоровым.

У больных РеА с затяжным течением по сравнению со здоровыми при поступлении на лечение в плазме (см. табл. 2) выше активность ГДА и ПНФ, ниже активность ГЗДА и ГФ, в лимфоцитах (см. табл. 3) выше только активность ГЗДА, а остальные энзимные различия малозначимы. Через 7–8 дней лечения в плазме снизилась активность ГДА ($p < 0,05$), ПНФ ($p < 0,05$), наметилась тенденция к повышению активности ГЗДА и ГФ ($p > 0,05$), в лимфоцитах существенной динамики энзимных показателей не произошло. По окончании курса лечения отмечалась положительная динамика всех

энзимных показателей и все они не отличались от аналогичных показателей у здоровых, за исключением ГЗДА в лимфоцитах ($p < 0,05$).

У больных с хроническим течением при поступлении на лечение по сравнению со здоровыми в плазме (см. табл. 2) выше только активность ПНФ, а остальные энзимные различия малозначимы, в лимфоцитах (см. табл. 3) ниже активность ГДА, ПНФ, выше активность ГЗДА и ГФ. Через 7–8 дней лечения существенной динамики активности энзимов в плазме и лимфоцитах не произошло ($p > 0,05$) и только наметилась тенденция в сторону нормализации энзимных показателей. По окончании курса лечения в плазме снизилась активность ГДА ($p < 0,001$), ПНФ ($p < 0,05$), повысилась активность ГЗДА ($p < 0,01$) и незначительно повысилась активность ГФ ($p > 0,05$), в лимфоцитах повысилась активность ГДА ($p < 0,01$), снизилась активность ГЗДА ($p < 0,05$), ГФ ($p < 0,05$). Перед выпиской из стационара активность энзимов в плазме не отличалась от таковой у здоровых. В лимфоцитах нормализовалась только активность ГДА, но активность ГЗДА ($p < 0,01$), ГФ ($p < 0,05$) осталась повышенной, а активность ПНФ ($p < 0,05$) – ниже, чем у здоровых. Между всеми вариантами течения болезни выявлены энзимные различия. Так, у больных с острым течением по сравнению с затяжным течением в плазме и лимфоцитах выше активность ГДА и ПНФ ($p < 0,001$), ниже ГЗДА ($p < 0,001$) и ГФ ($p < 0,01$), по сравнению с хроническим течением в плазме и лимфоцитах также выше активность ГДА и ПНФ ($p < 0,001$), ниже ГЗДА и ГФ ($p < 0,001$). У больных с затяжным течением по сравнению с хроническим течением в плазме выше активность ГДА ($p < 0,001$), ниже ГЗДА ($p < 0,01$), незначительно выше ПНФ и ниже ГФ (все $p > 0,05$), в лимфоцитах выше активность ПНФ ($p < 0,05$), ниже ГФ ($p < 0,05$), незначительно выше ГДА и ниже ГЗДА (все $p > 0,05$).

Далее нами была изучена активность энзимов у больных РеА в зависимости от инфекционных агентов, инициировавших заболевание. У больных урогенным РеА по сравнению со здоровыми (см. табл.

Таблица 3

Активность энзимов в лизатах лимфоцитов больных РеА с различным характером течения в процессе лечения

Контингент	Количество больных	Статистические показатели	ГДА	ГЗДА	ПНФ	ГФ
Больные РеА с острым течением, при поступлении	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	12,6*** 0,69 0,15	6,34*** 0,71 0,16	37,0** 2,19 0,49	10,7* 0,78 0,17
Больные РеА с острым течением, через 7–8 дней лечения	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	12,3 0,58 0,13	6,68 0,60 0,13	36,4 1,89 0,42	10,9 0,64 0,14
Больные РеА с острым течением, перед выпиской	20	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,6 0,31 0,07	7,50 0,25 0,06	34,9 0,98 0,22	11,5 0,24 0,05
Больные РеА с затяжным течением, при поступлении	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,4 1,05 0,24	8,71* 2,58 0,59	33,7 4,38 1,00	12,4 2,14 0,49
Больные РеА с затяжным течением, через 7–8 дней лечения	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,5 0,82 0,19	8,43 2,07 0,47	33,9 3,54 0,81	12,1 1,61 0,37
Больные РеА с затяжным течением, перед выпиской	19	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,6 0,21 0,05	7,94 0,77 0,18	34,2 1,78 0,41	11,6 0,42 0,10
Больные РеА с хроническим течением, при поступлении	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	10,8** 0,85 0,22	9,69*** 2,26 0,58	30,0*** 3,92 1,01	14,0*** 2,17 0,56
Больные РеА с хроническим течением, через 7–8 дней лечения	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,0 0,72 0,19	9,33 1,96 0,51	30,6 3,40 0,88	13,5 1,70 0,44
Больные РеА с хроническим течением, перед выпиской	15	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,64 0,33 0,08	8,28 1,12 0,29	32,1 2,54 0,66	12,5 0,80 0,21
Здоровые	30	<i>M</i> <i>σ</i> <i>t</i>	11,7 0,99 0,18	7,49 0,73 0,13	34,5 3,71 0,68	11,5 1,45 0,26

Примечание. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по отношению к здоровым.

1) в плазме выше активность ГДА и ПНФ, ниже активность ГЗДА и несколько ниже активность ГФ, в лимфоцитах ниже активность ГДА, ПНФ, выше активность ГЗДА и ГФ. У больных энтерогеиным РеА по сравнению со здоровыми (см. табл. 1) в плазме выше активность ГДА и ПНФ, ниже активность ГЗДА и ГФ, в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ниже активность ГЗДА и незначительно ниже активность ГФ ($p > 0,05$).

Сравнительные исследования показали, что у больных урогеиным РеА по сравнению с энтерогеиным РеА в плазме статистически значимых энзим-

ных различий не определялось, в лимфоцитах ниже активность ГДА, ПНФ, выше ГЗДА и ГФ (все $p < 0,001$).

Таким образом, проведенные исследования у больных РеА выявили существенные изменения активности энзимов пуринового метаболизма. Активность энзимов зависела от характера течения заболевания и инфекционного агента, инициировавшего заболевание. Так, чем острее было течение заболевания, тем в плазме выше активность ГДА, ГЗДА, ГФ и ниже ПНФ, в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ниже ГЗДА и ГФ. Не выявлено энзимных различий в плазме между урогеиным и энтерогеиным РеА, но в лимфоцитах эти различия были выражены с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$).

Обращает на себя внимание, что с увеличением длительности заболевания и хронизации процесса в плазме и лимфоцитах снижается ранее повышенная активность ГДА, ПНФ и повышается ранее сниженная активность ГЗДА и ГФ. Учитывая схему пуринового метаболизма, подобные изменения активности энзимов можно объяснить тем, что для трех ферментов – ПНФ, ГФ и ГЗДА гуанозин является общим субстратом и для поддержания нормального содержания гуанозина требуется их согласованная работа. То есть если повышается активность ключевого фермента ПНФ и идет интенсивное потребление гуанозина, то синхронно уменьшается потребление гуанозина в ГЗДА- и ГФ-реакциях. Подобное взаимодействие ферментов обеспечивает нормальный уровень гуанозина в клетках. Но при значительном снижении активности ПНФ происходит избыточное накопление гуанозина, и даже повышенная активность ГЗДА и ГФ не способна его уменьшить, так как их молярные активности по отношению к гуанозину значительно (в 2–3 раза) уступают ПНФ. О последствиях повышенного содержания гуанозина в лимфоцитах вследствие сниженной активности ПНФ достаточно хорошо известно: нарушаются процессы созревания, пролиферации и дифференциации лимфоцитов, что может привести к дискоординации

иммунных процессов. Таким образом, подобные изменения активности энзимов пуринового метаболизма могут обусловить некоторые патогенетические механизмы РеА, инициировать и поддерживать иммунные нарушения при этом заболевании. Исходя из этого, одним из перспективных альтернативных подходов в лечении больных РеА может быть терапия, направленная на коррекцию энзимных нарушений с использованием естественных активаторов ПНФ.

Выводы

1. Между всеми вариантами течения РеА в плазме и лимфоцитах выявлены существенные энзимные различия. Чем острее течение заболевания, тем в плазме выше активность ГДА, ГЗДА, ГФ и ниже ПНФ, в лимфоцитах выше активность ГДА, ПНФ, ниже ГЗДА и ГФ.

2. У больных урогенным РеА по сравнению с больными энтерогенным РеА в лимфоцитах ниже активность ГДА, ПНФ, выше активность ГЗДА и ГФ. В плазме существенных энзимных различий не выявлено.

3. Изученные энзимные показатели в плазме крови больных РеА в комплексе с клиническими данными могут способствовать объективизации оценки эффективности проводимой терапии в ранние сроки (первые 7–8 дней).

4. Энзимные нарушения пуринового метаболизма в лимфоцитах могут представлять собой один из патогенетических механизмов РеА.

Литература

1. Агабабова Э.Р., Бунчук Н.В., Шубин С.В. и др. // *Научно-практическая ревматология*. — 2003. — № 3. — С. 82-83.
2. *Болезни суставов: Руководство для врачей / Под ред. Мазурова В.И.* — Спб.: СпецЛит, 2008. — 397 с.
3. Земсков В. М. // *Иммунология*. — 1990. — № 3. — С. 4–8.
4. *Клиническая ревматология: Руководство для практических врачей / Под ред. Мазурова В.И.* — Спб.: Фолиант, 2001. — С. 138-152.
5. Тогузов Р.Т., Тихонов Ю.В., Талицкий В.В. и др. // *Вестник АМН СССР*. — 1986. - №8. — С.40-52.
6. Boyum A. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1968. — Vol. 21. — Suppl. 97 (Paper IV) — P. 77-89.
7. Braun I., Kingsley B., Van der Heijde D., et al. // *J. Rheumatol.* — 2000. — Vol. 27. — P. 2185-2192.
8. Caraway W.T. // *Clin. Chem.* — 1966. — Vol. 12. — P. 187-193.
9. Rihl M., Kohler L., Kloss A., Zeidler H. // *Ann. Rheum. Dis.* — 2006. — Vol. 65. — P. 281-284.
10. Robertson B.C., Hoffee P.A. // *J. Biol. Chem.* — 1973. — Vol.248. №6. — P.2040-2043.
11. Yamamada W. // *J. Biol. Chem.* — 1961. — Vol. 236. - № 11. — P. 3043-3046.