

АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИЗАТОВ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ

О. О. ЯНОВИЧ¹, Л. П. ТИТОВ¹, М. И. ДЮСЬМИКЕЕВА², Н. С. ШПАКОВСКАЯ²

ACTIVITY OF BLOOD PLASMA ADENOSINE DEAMINASE AND MONONUCLEAR CELL LYSATES IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS WITH DIFFERENT LEVELS OF RESISTANCE TO ANTI-TUBERCULOSIS AGENTS

O. O. YANOVICH¹, L. P. TITOV¹, M. I. DUSMIKEYEVA², N. S. SHPAKOVSKAYA²

¹РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь

²РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, г. Минск, Республика Беларусь

¹Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Tuberculosis, Minsk, Republic of Belarus

Цель работы – исследовать активность аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов у пациентов с туберкулезом легких в зависимости от лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

Выявлено, что содержание АДА в плазме крови достоверно выше у пациентов, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ) с лекарственной устойчивостью, у пациентов, выделяющих МБТ с множественной/широкой лекарственной устойчивостью (М/ШЛУ), отмечено незначительное увеличение активности фермента, что может свидетельствовать о снижении активности иммунной системы.

Показано, что при туберкулезе легких с лекарственной чувствительностью возбудителя прирост общей активности АДА в плазме крови происходит за счет повышения активности обоих изоферментов, а у больных, выделяющих МБТ с М/ШЛУ, увеличение активности фермента происходит за счет прироста АДА₂.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, туберкулез легких, лекарственная устойчивость.

The purpose of this research is to investigate the activity of adenosine deaminase and its isozymes in pulmonary tuberculosis patients depending on resistance of mycobacteria to anti-tuberculosis agents.

It has been found out that the ADA level on blood plasma is higher in the patients with drug resistant mycobacteria, in the patients with multiple/extensive drug resistant mycobacteria (M/XDR) insignificant increase on enzyme activity has been observed, which can be the evidence of the immune system activity suppression.

It has been shown that in case of drug susceptible pulmonary tuberculosis the increase of general ADA activity in blood plasma is due to increase of activity in both isozymes and in patients with M/XDR mycobacteria the increase of enzyme activity happens due to the increase in ADA₂.

Key words: adenosine deaminase, pulmonary tuberculosis, drug resistance.

Туберкулез – специфическое инфекционное заболевание, развивающееся в ответ на внедрение в организм и внутриклеточную репродукцию микобактерий туберкулеза (МБТ) в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. Возбудитель поражает все органы и системы организма человека, но наиболее часто легочной тракт. В 2012 г. из 8,6 млн заболевших туберкулезом легких умерло 1,3 млн человек.

Ключевой проблемой данного заболевания является установление молекулярно-клеточных механизмов, ответственных за развитие разных клинических форм туберкулеза. Особенно тревожит увеличение в последние годы частоты развития лекарственной устойчивости МБТ и, соответственно, увеличение числа случаев тяжелого течения инфекции [8].

В 2006 г. стали появляться первые сообщения о туберкулезе с широкой лекарственной устой-

чивостью (ШЛУ) [3, 10]. ШЛУ определяется как выделение от пациентов МБТ с устойчивостью по меньшей мере к изониазиду и рифампицину, а также к какому-либо фторхинолону и к какому-либо из трех инъекционных препаратов второй линии (амикацину, капреомицину и канамицину).

Фермент аденозиндезаминаза (АДА) находится в цитоплазме клеток всех тканей млекопитающих. Он участвует в катаболизме пуриновых нуклеозидов и катализирует превращение аденозина в инозин, а дезоксиаденозина в дезоксиинозин. Это превращение является важным этапом в серии молекулярных событий, отвечающих за экспрессию генов, пролиферацию, дифференцировку и функциональные свойства лимфоцитов [7]. Установлено, что уровень данного фермента увеличивается при различных заболеваниях, связанных с антигенной и цитокиновой стимуляцией

клеток иммунной системы (лимфоциты, моноциты, макрофаги) [1, 6].

Туберкулез различной локализации является одним из таких заболеваний. Рядом исследований подтверждена диагностическая значимость АДА у пациентов с туберкулезным плевритом, перикардитом и перитонитом, особенно в странах с высокой заболеваемостью туберкулезом [2, 4, 5, 9]. Вместе с тем практически отсутствуют данные об исследовании активности АДА у пациентов с туберкулезом легких в зависимости от лекарственной устойчивости МБТ.

Цель работы – исследовать активность АДА и ее изоферментов у пациентов с туберкулезом легких в зависимости от лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

Материалы и методы

Характеристика группы пациентов с туберкулезом легких и контрольной группы

Под наблюдением находились 35 пациентов с туберкулезом легких, проходивших лечение в ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии» в 2012-2013 гг. (средний возраст – $42,1 \pm 2,7$ года, 25 мужчин и 10 женщин). Контрольную группу сравнения составили 42 здоровых человека (средний возраст $36,2 \pm 1,8$ года, 20 мужчин и 22 женщины, $p > 0,05$).

Верификацию диагноза туберкулеза легких проводили по результатам комплексного обследования больных, включавшего сбор анамнеза, клиническое обследование, изучение показателей общего анализа крови, биохимии крови, рентгенографическое исследование органов грудной клетки и микробиологическое обследование на *M. tuberculosis*.

В зависимости от данных теста лекарственной чувствительности (ЛЧ) на наличие устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным лекарственным средствам все пациенты разделены на две группы. Первая группа – 17 человек с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (М/ШЛУ) МБТ (устойчивость одновременно к изоцианиду и рифампицину с дополнительной устойчивостью к любому фторхинолону и хотя бы к одному из инъекционных препаратов второго ряда). Вторая группа – 18 человек с туберкулезом легких, выделяющих МБТ с ЛЧ к противотуберкулезным препаратам.

В первой группе преобладали пациенты с диагнозом инфильтративного туберкулеза легких – 11 (64,7%) человек, с фиброзно-кавернозным туберкулезом был один (5,9%) человек, с очаговым туберкулезом – один (5,9%) и с казеозной пневмонией – 3 (17,6%). Во второй группе клинические формы туберкулеза также представлены преимущественно инфильтративным туберкулезом – 14 (77,7%). Другие формы туберкулеза наблюдались в единичных случаях: диссеминированный – у одного (5,6%)

человека, очаговый – у одного (5,6%), фиброз – у 2 (11,1%).

Распределение пациентов в зависимости от истории предшествующего заболевания и лечения показало, что в первой группе 29,4% (5 человек) были впервые выявленные пациенты, пациенты с неудачей после лечения и рецидивом заболевания составляли 70,6% (12 человек). У всех пациентов второй группы туберкулез был выявлен впервые.

Определение АДА в плазме крови и лизатах мононуклеарных клеток

Активность фермента исследовали в плазме крови (АДАп) и лизатах мононуклеарных клеток (АДАмпк) колориметрическим методом по методу Giusti G. (1974).

Для получения биологического материала проводили забор 5 мл крови в пробирки с ЭДТА и центрифугировали при 1 500 об/мин в течение 15 мин. Часть полученной плазмы использовали для определения активности АДА, клеточную суспензию подвергали дифференциальному центрифугированию по методу Boyum (1968), основанному на различиях удельной массы клеток разных популяций. На 2 мл смеси фиколл-верографина (плотность 1,077 кг/л) наслаивали 4 мл крови. Центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. В ходе центрифугирования проходило разделение клеток. Лимфоциты и моноциты оставались на поверхности градиента, а эритроциты и гранулоциты оседали на дне пробирки.

Разделенные мононуклеары трижды промывали физраствором и в течение 5 мин центрифугировали при 1 500 об/мин. Осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в физрастворе в концентрации 1×10^6 клеток в мл. Полученные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) разрушали замораживанием-оттаиванием.

За 1 ед активности фермента АДА принимали количество фермента, необходимого для выделения 1 мкмоль аммиака в минуту из аденозина при стандартных условиях – 37°С. Активность АДА в МКПК измеряли на 1×10^6 клеток.

Дифференцированное определение активности изоферментов АДА1 и АДА2 проведено с использованием в качестве субстратов аденозина и дезоксиаденозина. Активность 2-дезоксиАДА, изоферментов АДА-1 и АДА-2 в общей активности АДА определяли на основании различного сродства фермента к субстратам аденозину и дезоксиаденозину, активность изоферментов в общей активности АДА – путем расчета дезаминазного коэффициента (2-дезоксиАДА/АДА).

Для статистического анализа полученных результатов использовали компьютерную программу Statistica 7. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка. Для сравнения двух групп использовали метод Манна – Уитни. Критерием достоверности считалось достижение уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

1. Состояние активности АДА в плазме крови пациентов с туберкулезом легких

При сравнении уровня АДАп в двух группах пациентов с туберкулезом легких в зависимости от чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам (рис. 1) выявлено достоверное увеличение активности фермента у пациентов, выделяющих МБТ с ЛЧ, по сравнению с группой здоровых лиц ($25,9 \pm 6,3$ против $10,4 \pm 0,6$ ед/л, $p < 0,05$). Средние значения АДАп в группе пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ, не отличались от контрольного значения ($13,3 \pm 1,3$ против $10,4 \pm 0,6$ ед/л, $p > 0,05$).

Не выявлено достоверных отличий в активности АДА в зависимости от активности туберкулезного процесса. Анализ активности АДА в зависимости от типа предшествующего лечения пациента показал достоверное увеличение данного показателя у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких по сравнению с пациентами после неудачного лечения или рецидива ($23,3 \pm 4,9$ против $12,5 \pm 1,5$ ед/л, $p < 0,05$).

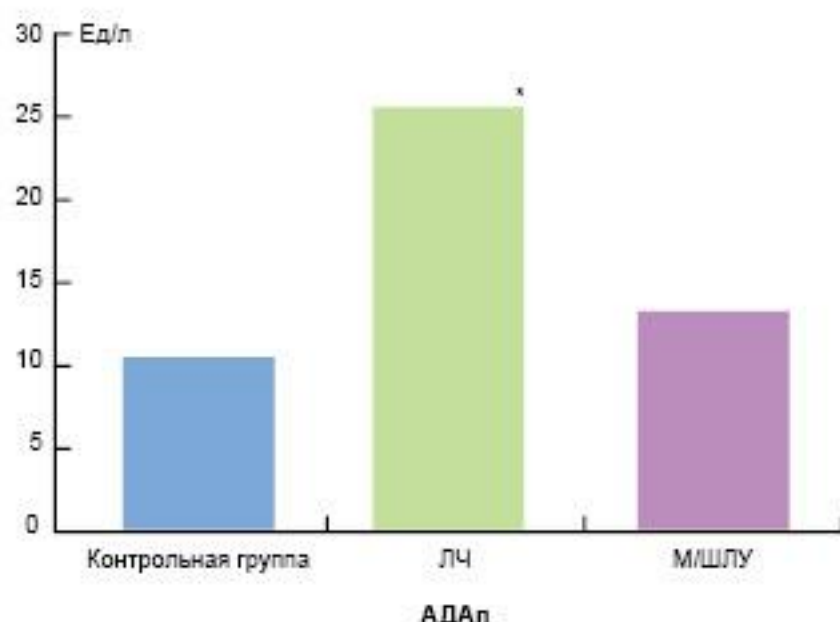


Рис. 1. Уровень общей активности АДАп пациентов с туберкулезом легких и у здоровых лиц; * – достоверно при сравнении с контрольной группой и группой М/ШЛУ, $p < 0,05$

С целью установления вклада изоферментов АДА в общую активность фермента изучено распределение изоформ фермента в двух исследованных группах пациентов с туберкулезом легких (табл. 1). В группе пациентов, выделяющих МБТ с ЛЧ, выявлена достоверно повышенная активность изоформ АДА1 и АДА2 по сравнению с контролем и пациентами, выделяющими МБТ с М/ШЛУ ($p < 0,05$). В группе пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ, наблюдается достоверное увеличение АДА2 без изменения активности АДА1.

Сопоставление средних значений коэффициента 2'-дезоксАДА/АДА выявило их достоверное различие в двух группах пациентов с туберкулезом легких – $0,36 \pm 0,02$ в группе пациентов, выделяющих МБТ с ЛЧ, и $0,29 \pm 0,02$ в группе пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ ($p < 0,05$), что указывает на преобладание изофермента АДА2 в общей активности АДА у пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ.

2. Состояние активности АДА в лизатах МКПК пациентов с туберкулезом легких

Уровень АДА в лизатах МКПК среди пациентов с туберкулезом легких с различной чувствительностью микобактерий к противотуберкулезным лекарственным средствам характеризуется достоверным увеличением активности фермента по сравнению с контролем (рис. 2). Наиболее высокой активностью АДАмкпк была в группе пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ, и составила $6,9 \pm 0,9$ ед/л ($p < 0,05$). Среди пациентов, выделяющих МБТ с ЛЧ, значения этого показателя составили $6,0 \pm 1,1$ ед/л ($p < 0,05$).

Сравнение активности изоформ АДА в лизатах МКПК в двух исследованных группах и контроле (табл. 2) свидетельствует, что активность АДА1 была наибольшей среди пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ. При отсутствии лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам активность изоферментов была выше, но достоверно не отличалась от контроля. Уровни изофермента АДА2 достоверно увеличены в обеих исследованных группах. Указанные изменения в уровнях изоферментов могут объяснить увеличение общей активности АДА в мононуклеарах у пациентов, выделяющих МБТ с М/ШЛУ.

Таблица 1

Активность АДА1 и АДА2 в плазме крови пациентов с туберкулезом легких и здоровых лиц

Группы обследованных	Активность изоферментов		2'-дезоксАДА/АДА
	АДА1, ед/л	АДА2, ед/л	
Здоровые ($n = 22$)	$2,30 \pm 0,37$	$6,7 \pm 0,6$	$0,33 \pm 0,03$
ТБЛ с ЛЧ ($n = 18$)	$8,1 \pm 2,5^*$	$19,3 \pm 4,6^*$	$0,36 \pm 0,02$
ТБЛ с М/ШЛУ ($n = 17$)	$2,9 \pm 0,3$	$10,5 \pm 1,1^{**}$	$0,29 \pm 0,02^{***}$

Примечание: * – достоверно при сравнении с контрольной группой и группой с М/ШЛУ, $p < 0,05$; ** – достоверно при сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$; *** – достоверно при сравнении с группой с М/ШЛУ, $p < 0,05$.

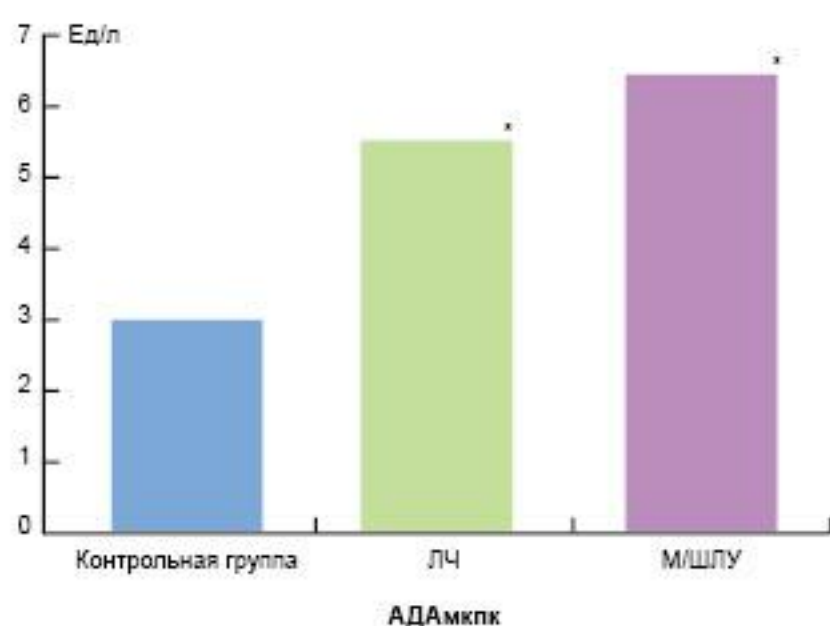


Рис. 2. Общая активность АДА в лизатах МПКК пациентов с туберкулезом легких и у здоровых лиц; * – достоверно при сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$

Таблица 2

Активность изоферментов АДА в лизатах МПКК пациентов с туберкулезом легких и здоровых лиц

Группы обследованных	Активность изоферментов	
	АДА1, ед/л	АДА2, ед/л
Здоровые ($n = 12$)	$1,9 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$
ТБЛ с ЛЧ ($n = 17$)	$2,4 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,5^*$
ТБЛ с М/ШЛУ ($n = 15$)	$3,6 \pm 0,7^*$	$2,9 \pm 0,4^*$

Примечание: * – достоверно при сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baganha M., Pego A., Lima M. A. et al. Serum and pleural adenosine deaminase: Correlation with lymphocytic populations // *Chest*. – 1990. – Vol. 97, № 3. – P. 605-610.
2. Bhargava D. K., Gupta M., Nijhown S. et al. Adenosine deaminase (ADA) in peritoneal tuberculosis: diagnostic value in ascitic fluid and serum // *Tubercle*. – 1990. – Vol. 71, № 2. – P. 121-126.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2006. – Vol. 55, № 11. – P. 301-305.
4. Martinez-Vasquez J. M., Ribera E., Ocana I. et al. Adenosine deaminase activity in tuberculous pericarditis // *Thorax*. – 1986. – Vol. 41, № 11. – P. 88-89.
5. Ribera E., Martinez-Vasquez J. M., Ocana I. et al. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow up tuberculous meningitis in adults // *J. Infect. Dis.* – 1987. – Vol. 155, № 4. – P. 603-607.
6. Shammery F. J. Adenosine deaminase activity in serum and pleural effusions of tuberculosis and non-tuberculous patients // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – Vol. 43, № 4. – P. 763-779.

7. Shore A., Dosch H. M., Gelfond E. W. Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation // *Clin. Exp. Immunol.* – 1981. – Vol. 44, № 1. – P. 152-155.
8. Surkova L., Horevich H. L., Titov L. P. et al. A study on demographic characteristics of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Belarus // *Int. J. Micobac.* – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 75-81.
9. Valdes L., Jose E. S., Alvarez D. et al. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role and relevance to the origin of increased ADA in tuberculosis pleurisy // *Eur. Respir. J.* – 1996. – Vol. 9. – P. 747-751.
10. World Health Organization (WHO). Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR.TB): recommendations for prevention and control // *Weekly Epidemiol Record*. – 2006. – Vol. 81. – P. 430-432.

REFERENCES

1. Baganha M., Pego A., Lima M.A. et. al. Serum and pleural adenosine deaminase: Correlation with lymphocytic populations. *Chest*, 1990, vol. 97, no. 3, pp. 605-610.
2. Bhargava D.K., Gupta M., Nijhown S. et al. Adenosine deaminase (ADA) in peritoneal tuberculosis: diagnostic value in ascitic fluid and serum. *Tubercle*, 1990, vol. 71, no. 2, pp. 121-126.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2006, vol. 55, no. 11, pp. 301-305.
4. Martinez-Vasquez J.M., Ribera E., Ocana I. et al. Adenosine deaminase activity in tuberculous pericarditis. *Thorax*, 1986, vol. 41, no. 11, pp. 88-89.
5. Ribera E., Martinez-Vasquez J.M., Ocana I. et al. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow up tuberculous meningitis in adults. *J. Infect. Dis.*, 1987, vol. 155, no. 4, pp. 603-607.
6. Shammery F.J. Adenosine deaminase activity in serum and pleural effusions of tuberculosis and non-tuberculous patients. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1997, vol. 43, no. 4, pp. 763-779.
7. Shore A., Dosch H.M., Gelfond E.W. Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, vol. 44, no. 1, pp. 152-155.
8. Surkova L., Horevich H.L., Titov L.P. et al. A study on demographic characteristics of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Belarus. *Int. J. Micobac.*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 75-81.
9. Valdes L., Jose E.S., Alvarez D. et al. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role and relevance to the origin of increased ADA in tuberculosis pleurisy. *Eur. Respir. J.*, 1996, vol. 9, pp. 747-751.
10. World Health Organization (WHO). Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR.TB): recommendations for prevention and control. *Weekly Epidemiol Record*. 2006, vol. 81. pp. 430-432.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Янович Ольга Олеговна

РНИЦ эпидемиологии и микробиологии,
кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории клинической и экспериментальной
микробиологии.

220114, Беларусь, г. Минск, ул. Филимонова, д. 23.

Тел./факс: 8 (017) 267-95-33; 8 (017) 267-30-93.

E-mail: oyanov74@mail.ru

Поступила 17.07.2014