

*С.М. Алинешад<sup>1</sup>, Г.Л. Гуревич<sup>2</sup>, Ф.И. Захаревский<sup>2</sup>, А.Д. Таганович<sup>1</sup>*

## **Дифференциально-диагностическое значение определения аденозиндезаминазы и ее изоферментов в крови при туберкулезном плеврите**

*Белорусский государственный медицинский университет  
Научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии*

Исследовалась возможность определения активности аденозиндезаминазы (АДА) в качестве одного из маркеров плеврального выпота туберкулезной этиологии. Выявлены более высокие активности АДА1 и АДА2 в лимфоцитах и эритроцитах, а также значительное увеличение активности АДА2 в сыворотке крови больных туберкулезным плевритом. Таким образом, показано, что изменения активности АДА и ее изоферментов специфичны для плеврита туберкулезной этиологии и могут представлять диагностическую ценность. Ключевые слова: аденозиндезаминаза, туберкулезный плеврит, сыворотка крови, лимфоциты, эритроциты.

Одной из главных причин смертности от инфекционных заболеваний является туберкулез органов дыхания [10], который нередко осложняется плевритом (31%). Туберкулезный плеврит создает трудности в дифференциальной диагностике данного состояния, основанной на микробиологических тестах, плевральной биопсии, радиографии, полимеразной цепной реакции, иммуноферментном анализе [2, 5, 13]. В качестве одного из возможных маркеров плеврального выпота туберкулезной этиологии может служить высокая активность аденозиндезаминазы (АДА) [18].

Вовлеченный в катаболизм пуриновых нуклеозидов фермент АДА локализован в цитоплазме клеток всех тканей млекопитающих и катализирует дезаминирование аденозинина и превращение его в инозин, а дезоксиаденозина — в дезоксиинозин. Установлено, что АДА играет важную роль в развитии и функционировании клеток крови. У людей, имеющих недостаточную активность данного фермента, наблюдается дисфункция иммунного ответа, что связано с неадекватным метаболизмом аденозина и 2'-дезоксиаденозина [9].

Имеется много сообщений о результатах исследования активности АДА в плевральной жидкости. Большинство исследователей пришло к заключению об ее увеличении при плеврите туберкулезной этиологии [4, 9]. Гораздо меньше информации об изменении активности АДА в крови. Между тем, получение образцов крови для анализа этого показателя — менее инвазивная и трудоемкая процедура, которая может применяться и в отсутствие плеврального выпота у больного. При карциноме гортани, миелоидной лейкемии, тифозной лихорадке и малярии характерно было увеличение активности данного фермента в белых и красных клетках крови [6, 7, 17, 19], в то время как при аутоиммунных заболеваниях на фоне приема больными антидепрессантов, активность АДА в данных клетках, напротив, была снижена [19]. В плазме крови активность АДА также была подвержена колебаниям при патологии. Значительное ее увеличение отмечалось у

больных СПИД, гепатитом, кожным лейшманиозом, малярией, болезнью легионеров [3, 4, 9, 11, 16].

Целью нашего исследования являлось определение общей активности АДА, а также ее основных изоформ АДА1 и АДА2 в сыворотке крови, лимфоцитах и эритроцитах пациентов с туберкулезным плевритом и сравнение полученных значений с аналогичными показателями ферментативной активности у пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии и здоровых людей.

#### Материал и методы

Нами была определена активность аденозиндезаминазы и ее изоформ в сыворотке крови, лимфоцитах и эритроцитах 45 пациентов, находящихся на лечении в институте пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ. На основании совокупности результатов клинических, биохимических и радиологических исследований у 22 из вышеуказанных пациентов был диагностирован плеврит туберкулезной, а у 23 — нетуберкулезной этиологии (идиопатический, парапневмонический, послеоперационный плеврит или неспецифическая эмпиема плевры). Еще 25 здоровых добровольцев, не имеющих легочной патологии, составляли контрольную группу. Средний возраст составлял 43,1 и 48,4 у больных, 46,7 в контрольной группе.

Для получения биологического материала 6 мл отобранной у пациентов венозной крови переносили в пробирки с гепарином и в течение 9 мин центрифугировали при 1000g. Полученную сыворотку крови использовали для определения активности АДА. Клеточную суспензию подвергали дальнейшему дифференциальному центрифугированию в смеси 9% фиколла и 33,9% верографина с плотностью 1,077 г/мл. В ходе центрифугирования происходило разделение клеток. Лимфоциты и моноциты оставались на поверхности градиента, а эритроциты и гранулоциты оседали на дно пробирки.

Разделенные лимфоциты и эритроциты трижды промывали раствором Хэнкса и в течение 5-7 мин центрифугировали при 1500g. По окончании данной процедуры осадок, содержащий лимфоциты, ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды с добавлением 1 мл фосфатного буфера (pH = 6,5). Полученную смесь гомогенизировали в стеклянном шариковом гомогенизаторе и использовали для определения активности АДА и концентрации белка.

Образцы для исследования активности АДА в эритроцитах получали 10-кратным разбавлением 300 мкл суспензии указанных клеток 2 мМ фосфатным буфером (pH 6,5). В гипотонической среде происходил гемолиз эритроцитов, что сопровождалось разрушением клеток и выходом цитоплазматического содержимого.

Активность АДА в сыворотке крови, лимфоцитах и эритроцитах определяли при температуре 37°C согласно методу, описанному Giusti G. и Galanti B. [8]. Результаты выражались в международных единицах активности мкмоль/мин?л для сыворотки крови, мкмоль/мин?мг белка – для лимфоцитов и мкмоль/мин?10<sup>8</sup> клеток – для эритроцитов. Определение концентрации белка проводили, используя метод Лоури [14], результаты выражали в мг/л.

Для определения активности изоформ АДА1 и АДА2 применялся селективный ингибитор АДА1 — эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)-аденозин

гидрохлорид (Sigma, США) [2, 9]. Определение активности АДА2 проводилось аналогично описанной выше процедуре в присутствии в реакционной смеси 200 мкмоль/л ингибитора. Значение активности АДА1 высчитывалось как разница между общей активностью АДА и показателем активности АДА2.

Для статистического анализа полученных данных использовалась программа «Statistica 6.0». Проверка данных на нормальность распределения осуществлялась при помощи W-критерия Шапиро-Уилка. Достоверность между группами определялась на основании t-теста Стьюдента. Результаты считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ).

#### Результаты и обсуждение

Общая активность АДА в сыворотке крови у пациентов с туберкулезным плевритом, практически, в 2 раза превышала таковые значения у пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии (табл. 1). Активность АДА в лимфоцитах и эритроцитах у пациентов первой группы также была выше: в 1,5 и 1,8 раза, соответственно. Еще более выраженными как в сыворотке, так и в клетках крови были различия в величине активности исследуемого фермента между группой с туберкулезным плевритом и контрольной группой. В то же время, между значениями активности АДА в группе больных неспецифическим плевритом и группе здоровых добровольцев никаких статистически значимых различий выявлено не было.

Таблица 1

Общая активность АДА в сыворотке и клетках крови больных с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии

Исследуемый материал	Туберкулезный плеврит	Плеврит нетуберкулезной этиологии	Контрольная группа
Сыворотка крови	35.34 $\pm$ 7.02*	17.69 $\pm$ 5.49	12.97 $\pm$ 2.94
Лимфоциты	7.25 $\pm$ 2.44*	4.84 $\pm$ 1.28	4.35 $\pm$ 1.71
Эритроциты	36.35 $\pm$ 15.62*	20.56 $\pm$ 7.41	18.90 $\pm$ 7.91

Примечание: \*-данные достоверны по отношению к контролю, #-данные достоверны по отношению к показателям в группе с плевритом нетуберкулезной этиологии.

Из полученных данных вычислялись возможные пороговые значения активности АДА в сыворотке крови при плеврите туберкулезной этиологии (табл. 2). Оптимальное пороговое значение приведено на рис. 1. В соответствии с имеющимися рекомендациями [1] оно находится в месте пересечения гауссовых кривых распределения значений этого показателя у больных плевритом туберкулезного и нетуберкулезного происхождения, и составляет 26,14 мкмоль/мин?л. Диагностическая чувствительность и специфичность метода при этом составляют, соответственно, 100 и 86,95%.



Рис. 1. Распределение активности АДА в группах больных туберкулезным или неспецифическим плевритом и контрольной группе

Таблица 2

Характеристика пороговых значений активности АДА в сыворотке крови для диагностики туберкулезного плеврита

Характеристика групп	Подходы к вычислению пороговых значений	Пороговые значения, мкмоль/мин·л	Чувствительность, %	Специфичность, %
Туберкулезный плеврит	M-6	28,32	81,81	91,30
	M-28	21,30	100	78,26
	M-36	14,28	100	26,08
Неспецифический плеврит	M+6	23,18	86,95	100
	M+28	28,67	95,65	81,81
	M+36	34,16	100	45,45

Аналогичное изменение показателей ферментативной активности в группе с туберкулезным плевритом по сравнению с контрольной группой и группой с плевритом нетуберкулезной этиологии, а также отсутствие значимых различий между двумя последними группами наблюдалось в отношении изоформ АДА (табл. 3, 4).

Таблица 3

Активность АДА1 в сыворотке и клетках крови больных с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии

Исследуемый материал	Туберкулезный плеврит	Плеврит нетуберкулезной этиологии	Контрольная группа
Сыворотка крови	6.82±4.17 <sup>а</sup>	5.70±3.95	4.19±2.25
Лимфоциты	3.69±2.18 <sup>а</sup>	2.76±0.73	2±0.81
Эритроциты	26.37±14.01 <sup>а*</sup>	14.01±5.79	15.17±6.48

Примечание: см. табл. 1.

Таблица 4

Активность АДА2 в сыворотке и клетках крови больных с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии

Исследуемый материал	Туберкулезный плеврит	Плеврит нетуберкулезной этиологии	Контрольная группа
Сыворотка крови	28.51±6.48 <sup>а</sup>	12±5.09	8.81±2.17
Лимфоциты	3.55±0.85 <sup>а</sup>	2.08±0.98	2.34±1.10
Эритроциты	10.02±4.51 <sup>а*</sup>	6.54±4.03	3.72±3.18

Примечание: см. табл. 1.

В сыворотке крови всегда превалировала изоформа АДА2, а в эритроцитах — АДА1. В лимфоцитах активность обоих изоферментов была, приблизительно, одинаковой. У больных туберкулезным плевритом доля АДА2 в общей ферментативной активности сыворотки крови была значительно выше, чем в группе с плевритом нетуберкулезной этиологии и контрольной группе (табл. 4). Другие исследователи также наблюдали преобладание в плазме крови изоферментной формы АДА2 [11].

Имеются единичные сообщения относительно определения АДА2 в плазме крови больных с плевритом туберкулезной этиологии [9]. Активность этого фермента также была повышена по сравнению с таковой у больных с плевритом нетуберкулезной этиологии и здоровых людей. Вообще, для инфекционных заболеваний, как оказалось, характерно увеличение активности АДА2 в сыворотке крови [12].

Наличие АДА является обязательным условием для дифференцировки лимфоидных клеток и созревания моноцитов и макрофагов. Предполагается, что увеличение активности АДА в сыворотке крови, наблюдаемое при инфекционных заболеваниях (малярия, кожный лейшманиоз, бруцеллез, СПИД), представляется закономерным, но неспецифическим признаком этих состояний [4, 17], поскольку отражает состояние клеточного иммунитета. Полученные же нами данные свидетельствуют о том, что повышение активности АДА в сыворотке и клетках крови не только сопутствует инфекционному процессу в органах дыхания, но и носит специфический характер.

Нами были обнаружены значительные отличия между активностью АДА в сыворотке крови, лимфоцитах и эритроцитах пациентов с туберкулезным плевритом по сравнению с активностью данного фермента у больных плевритом нетуберкулезной этиологии. Впервые получены сведения относительно изоферментного спектра АДА в клетках крови. Установлено, что в сыворотке крови увеличение общей активности АДА связано, главным образом, с изменением активности АДА2. Полагают, что данное повышение может быть связано с выходом указанной изоформы фермента в сыворотку крови из макрофагов при фагоцитозе

ими *Micobacterium tuberculosis* в ответ на стимуляцию интерфероном- $\gamma$  и интерлейкином-2, синтезируемых Т-хелперами [4, 18].

Есть сведения, что при инфекционном процессе изменяется метаболизм лимфоцитов и эритроидных клеток костного мозга, являющихся предшественниками эритроцитов. Считают, что данные метаболические нарушения приводят к повышенной экспрессии генов, кодирующих АДА и, в конечном итоге, к увеличению концентрации данного фермента [15]. Действительно, при туберкулезном плеврите активность АДА1 и АДА2 существенно превышала таковую у больных с плевритом нетуберкулезной этиологии. Однако степень увеличения была меньше, чем для этих ферментов в сыворотке крови. Таким образом, с одной стороны нами были получены аргументы в пользу того, что клетки крови являются источником увеличенной активности АДА в сыворотке крови при туберкулезном плеврите. С другой стороны, не обнаружено преимуществ в диагностической ценности этого показателя в клетках крови по сравнению с сывороткой. Если принять во внимание значительно более сложную процедуру получения и разделения клеток крови, равно как и определение в них активности АДА, очевидно преимущество сывороточного показателя.

#### Выводы

1. При плеврите туберкулезной этиологии в сыворотке крови больных наблюдается значительное увеличение активности АДА, связанное с повышением активности изоформы АДА2.

2. Активность АДА1 и АДА2 в лимфоцитах и эритроцитах больных туберкулезным плевритом также значительно выше, чем у больных неспецифическим плевритом и здоровых людей. Однако степень увеличения в данном случае менее выражена, чем в сыворотке крови.

3. Выявленные изменения активности АДА и ее изоферментов специфичны для плеврита туберкулезной этиологии и представляют диагностическую ценность. Установлено пороговое значение активности АДА в сыворотке крови при этой патологии — 26,14 мкмоль/мингл.

#### Литература

1. Меньшиков, В. В. Молекулярно-биологические исследования в клинической лабораторной диагностике: возможности и проблемы // *Клин. лаб. диагност.* – 2006. – №3. – С. 23 – 35.

2. Andreasyan, N.A., Hairapetian, H. L., Sargisova, Y.G. et al. Activity of adenosine deaminase and its isoforms in pleural fluid in tuberculous pleuritis // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – Vol. 8, N 10. – P. CR708 – 712.

3. Chittiprol, S., Satishchandra, P., Bhimasenarao, R.S. et al. Plasma adenosine deaminase activity among HIV1 Clade C seropositives: relation to CD4 T cell population and antiretroviral therapy // *Clin. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 377, N 1-2. – P. 133 – 137.

4. Erel, O., Kocyigit, A., Gurel, M.S. et al. Adenosine deaminase activities in sera, lymphocytes and granulocytes in patients with cutaneous leishmaniasis // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Rio de Janeiro – 1998. – Vol. 93, N 4. – P. 491 – 494.

5. Ferrer, J. Pleural tuberculosis // *Eur. Respir. J.* – 1997. – Vol. 10. – P. 942 – 947.

6. Galanti, B., Russo, M., Nardiello, S., Fiorentino, F. Adenosine deaminase activity of lymphocytes during typhoid fever (preliminary data) // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* – 1978. – Vol. 54, N 24. – P. 2609 – 2612.
7. Gierek, T., Drozd, M., Pilch, J. et al. Adenosine deaminase and purine phosphorylase in lymphocytes and red blood cells of patients with carcinoma of the larynx // *Auris. Nasus. Larynx.* – 1987. – Vol. 14, N 2. – P. 97 – 100.
8. Giusti, G., Galanti, B. // *Methods of enzymatic analysis.* – 1984. – Vol. 4. – P. 315 – 323.
9. Gorguner, M., Cerci, M., Gorguner, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions // *Respirology.* – 2000. – Vol. 5. – P. 321 – 324.
10. Hiraki, A., Aoe, K., Eda, R. et al. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis // *Chest.* – 2004. – Vol. 125. – P. 987 – 989.
11. Iwaki-Egawa, S., Yamamoto, T., Watanabe, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes // *Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 387, N 3. – P. 319 – 321.
12. Kataria, Y.P., Khurshid, I. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion // *Chest.* – 2001. – Vol. 120. – P. 334 – 336.
13. Khatami, K. Pleural tuberculosis // [Electronic resource]. – 2002. – Mode of access: [http://pearl.sums.ac.ir/semj/vol3/jul2002/Pleural TB.htm](http://pearl.sums.ac.ir/semj/vol3/jul2002/Pleural%20TB.htm)
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265.
15. Morton, J.C., Roscoe, O.B., Kenneth, J.W. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 1089 – 1091.
16. Nikaido, Y., Kido, M., Yoshida, S. Increased plasma adenosine deaminase activity in the early phase of Legionella pneumophila infection in guinea pigs // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1996. – Vol. 14, N 1. – P. 39 – 43.
17. Ozcan, E., Abdurrahim, K., Adnan, S. et al. Serum erythrocyte and leukocyte adenosine deaminase activities in patients with vivax malaria in Turkey // *J. Egypt. Soc. Parasitol.* – 1997. – Vol. 27, N 2. – P. 445 – 454.
18. Perez – Rodriguez, E., Castro, D.J. The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis // *Current Opinion in Pulm. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 259 – 266.
19. Storch, H., Kruger, W., Rotzsch, W. Adenosine deaminase activity in plasma and blood cells of patients with haematological and autoimmune diseases // *Acta Haematol.* – 1981. – Vol. 65, N 3. – P. 183 – 188.