

Правомерность использования активности аденозиндезаминазы и ее изоформы – аденозиндезаминазы-2 в диагностике туберкулезного плеврита

Н.А. Андреасян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА
375014 Ереван, ул. П. Севака 5/1

Ключевые слова: аденозиндезаминаза; туберкулез; диагностика туберкулезного плеврита; изоферменты аденозиндезаминазы

Аденозиндезаминаза (аденозинаминогидролаза, КФ 3.5.4.4, АДА) является одним из ключевых ферментов обмена пуриновых нуклеозидов. Фермент катализирует дезаминирование (дезоксид) аденозина с образованием (дезоксид) инозина и выделением аммиака [21] и содержится почти во всех тканях позвоночных [20] с наибольшей активностью в лимфоидных тканях [7]. Обнаружено несколько молекулярных форм АДА, различающихся молекулярной массой и кинетическими свойствами. Низкомолекулярная (34 – 38 кДа) и высокомолекулярная (280 кДа) формы схожи по кинетическим свойствам и классифицируются как изофермент АДА1 [5]. Имеется также изоформа с промежуточной молекулярной массой (100 – 114 кДа), отличающаяся от АДА1 каталитическими свойствами. Эта форма классифицируется как изофермент АДА2 [10,13].

Исследования последних 20 лет показали, что уровень АДА может быть использован в качестве достоверного теста (АДА-тест) для раннего диагностирования туберкулезного плеврита [3,19]. Подчеркивается корреляция высокой АДА-активности с остротой заболевания, когда своевременное начало лечения позволило спасти больных [1,6]. Предполагается, что уровень активности АДА в плевральной жидкости отражает клеточный иммунный ответ, в частности активацию Т-лимфоцитов [11]. Согласно ряду исследований, достоверность АДА-теста настолько высока, что авторы рекомендуют начинать противотуберкулезную терапию на основании его показателей, не дожидаясь результатов длительного микробиологического теста. Это позволяет выиграть время, ускоряет начало лечения и повышает его эффективность. Значимость введения быстрого, дешевого, не требующего специального оборудования АДА-теста особенно высока для регионов, удаленных от крупных медицинских центров, где недоступны дорогие

методы диагностирования.

Исследования показывают также, что за повышение уровня АДА в плевральном выпоте ответственен изофермент АДА2 [14]. Более высокий уровень активности АДА2 в плевральном выпоте по сравнению с сывороткой крови указывает на то, что он стимулируется в плевральной полости в результате воспалительных процессов, вызванных *Mycobacterium tuberculosis* [18]. В некоторых работах допускается, что уровень активности АДА2 может иметь более высокую эффективность в качестве теста на туберкулез, чем суммарная АДА-активность [12,15,16].

Ранее нами была показана положительная корреляция между уровнем активности АДА в плевральном выпоте и туберкулезом [2]. В настоящем исследовании поставлена задача сравнить правомерность использования суммарной АДА-активности и ее изофермента АДА2 для диагностики туберкулезного плеврита.

Материал и методы

Исследованием было охвачено 69 больных в возрасте 14 – 73 года (7 женщин и 62 мужчины). Были выделены 2 группы: I группа – 47 больных туберкулезом, II группа – контрольная – 22 больных плевритом нетуберкулезной этиологии.

Диагноз устанавливали по результатам анализа плевральной жидкости на удельную плотность, концентрацию белка и сахара, а также данных бактериоскопии, рентгенографии и клинических показаний.

Отобранные для определения активности АДА образцы плеврального выпота хранили при -10°C . Перед анализом образцы размораживали, гомогенизировали и определяли концентрацию белка и активность АДА.

Инкубационная смесь для определения активности АДА в объеме 0,5 мл содержала: 40 мМ К-фосфатный буфер (рН 6,5) и 20–100 мкл исследуемого образца. Ферментативную реакцию начинали добавлением 0,1 мл исходного раствора аденозина до конечной концентрации 4 мМ, смесь инкубировали 70 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением реагентов для определения образовавшегося аммиака колориметрическим методом, описанным в литературе [4,9]. Для определения активности АДА2 в пробу добавляли ингибитор активности АДА1 – эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)аденин (ЕННА) до конечной концентрации 40 мМ. Все пробы дублировали. Усредненные данные выражали в микромолях выделенного аммиака в минуту на литр плевральной жидкости (ед/л).

Белок определяли по методу Bradford [8], используя в качестве стандарта БСА фирмы "Sigma" (США), и спектрофотометрическим измерением оптического поглощения при 280 нм (коэффициент экстинкции – 1,02 мг/мл.см). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel Data Assay. Статистическую достоверность различия исследуемых параметров в контрольной группе и в группе туберкулезных больных оценивали по t-тесту Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Концентрация белка во всех исследованных пробах была равна 52 (19,4) мг/мл, в туберкулезной группе – 58,5 (17,2) мг/мл, в контрольной группе – 36,3 (14,7) мг/мл. В скобках приведено статистическое отклонение.

Среднестатистическая активность АДА во всех исследованных пробах была равна 31,6 (24,4) ед/л, в туберкулезной группе – 42,5 (21,7) ед/л, в контрольной группе – 8,4 (7,9) ед/л. Различия активностей АДА в двух группах высоко достоверно: $P < 3,2 \times 10^{-7}$. Этот результат позволяет нам рекомендовать применение АДА-теста при диагностировании туберкулезного плеврита в клиниках Армении, используя пороговое значение активности АДА, равное 20 ед/л. Расчет параметров для оценки АДА-теста дал следующие величины: чувствительность – 0,96, специфичность – 0,91, эффективность – 0,94, прогностическая значимость при положительном результате – 0,96, прогностическая значимость при отрицательном результате – 0,94 [2].

Очевидно, что пороговое значение какого-либо теста, используемого для диагностирования патологии, требует некоторого компромисса между значениями, обеспечивающими высокую чувствительность

или высокую специфичность теста. Для четкого диагностирования заболевания необходима стопроцентная специфичность используемого теста. Если же данный тест рассматривается как средство предварительного скрининга для выявления группы риска, следует остановиться на некотором разумном соотношении между значениями чувствительности и специфичности теста.

Была определена активность АДА2 у 20 туберкулезных больных и у 10 больных контрольной группы для сравнения прогностической ценности в диагностировании туберкулеза суммарной АДА-активности и активности ее изофермента АДА2. Построены графики зависимости чувствительности теста от величины (1–специфичность) при различных величинах пороговой активности, что позволяет выявить пороговое значение, при котором специфичность теста равна 100% [6,17].

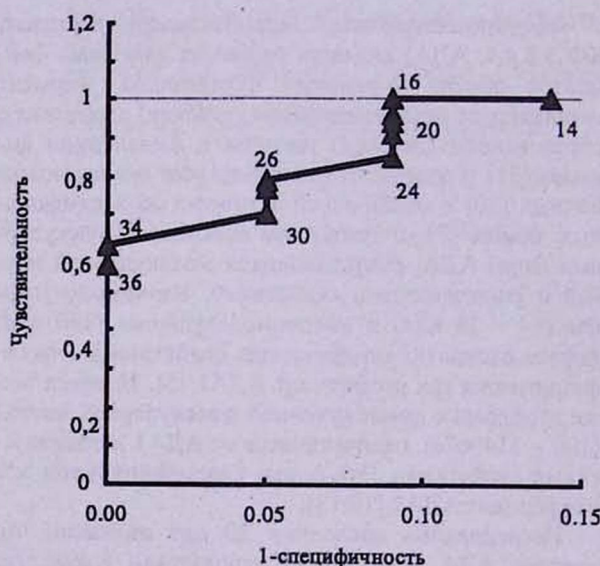


Рис. 1. Зависимость чувствительности от 1–специфичности для различных пороговых значений суммарной активности АДА. Величины пороговой активности, при которых оценены параметры, указаны на точках.

На рис.1 представлена зависимость чувствительности АДА-теста (1–специфичность) при пороговой активности АДА от 14 до 36 ед/л. Как видно из приведенной зависимости, 100% специфичность данного теста обеспечивается при значении пороговой активности АДА, равном 34 ед/л. Это означает, что при суммарной АДА-активности выше этой величины следует начинать противотуберкулезную терапию больного, не дожидаясь результатов других долговременных тестов (посев мокроты, плевральной жидкости, образцов биопсии на выявление *Mycobacterium tuberculosis* и пр.).

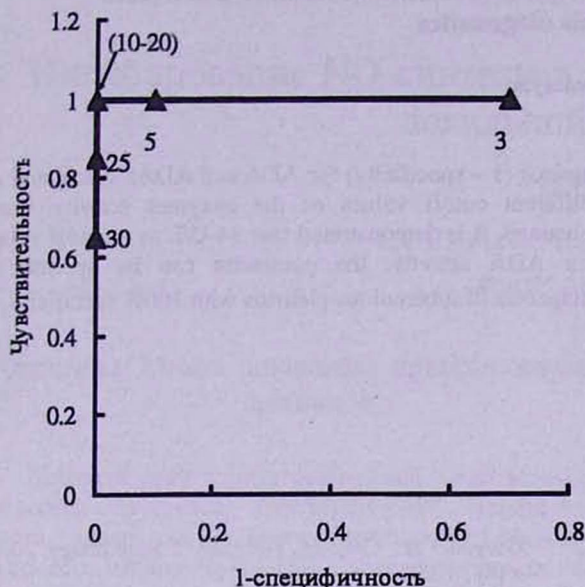


Рис. 2. То же, что на рис. 1, для активности АДА2.

На рис. 2 представлена аналогичная зависимость для АДА2. Точки получены для величин пороговой активности изофермента от 3 до 30 ед/л. Приведенный график показывает, что для значений пороговой активности в диапазоне от 10 до 20 ед/л АДА2-тест обеспечивает 100% чувствительность и 100% специфичность. Исходя из этого, можно считать оправданным мнение ряда исследователей, которые предпочитают использовать в качестве теста для диагностирования туберкулеза активность АДА2 [15,16]. Однако учитывая несколько большую трудо-

емкость определения АДА2, для которого требуется к тому же дополнительный дорогостоящий реагент – ЕННА, и имея в виду более предпочтительное значение коэффициента Стьюдента (Р) при сравнении результатов АДА и АДА2 в двух исследуемых группах пациентов (таблица), в качестве теста для диагностирования туберкулеза вполне резонно использовать суммарную активность АДА.

Таблица

Суммарная активность АДА и активность ее изофермента АДА2 в туберкулезной и контрольной группах

Фермент	Активность, ед/л		Р
	I группа	II группа	
АДА	47,3 (18,04)	4,8 (1,4)	$< 2,53 \cdot 10^{-7}$
АДА2	38,6 (17,7)	3,3 (1,5)	$< 3,67 \cdot 10^{-6}$

Примечание. В скобках приведено статистическое отклонение

Нет сомнения в том, что абсолютным доказательством туберкулезной природы заболевания любого органа является обнаружение туберкулезной бациллы. Однако преимущество предлагаемого теста заключается в возможности сокращения времени выявления патологии и начала ее лечения до получения ответа долговременного теста бактериоскопии.

Поступила 17.03.02

Աղենոգինդեամինազի և նրա իզոմեր՝ աղենոգինդեամինազ 2-ի ակտիվության օգտագործման իրավասությունը փութերկուլոզային պլերիտի ախտորոշման համար

Ն. Ա. Անդրեսյան

Հայաստանի տարբեր հիվանդանոցների 69 հիվանդների պլերալ հեղուկում չափվել է աղենոգինդեամինազի (ԱԴԱ) գոնադային և նրա իզոմերներն աղենոգինդեամինազ 2-ի (ԱԴԱ2) ակտիվությունը: Տուբերկուլոզի դեպքում դիտվել է ֆերմենտի ակտիվության մակարդակի ցայտուն բարձրացում: Այս ակտիվության փոփոխությունները

որպես պաթոլոգիայի թեստ օգտագործելու նպատակով դիտարկվել են նրանց զգայնության կախվածությունը (1-սպեցիֆիկությունը) տարբեր շնչային արժեքներից: Պարզվել է, որ ԱԴԱ ակտիվության 34 Ս/Լ արժեքը կարող է կիրառվել տուբերկուլոզային պլերիտների ախտորոշման համար որպես 100% զգայնությամբ շնչային արժեք:

Relevance of adenosine deaminase and its isoenzyme adenosine deaminase-2 activities in pleural tuberculosis diagnostics

N. A. Andreassyan

The activities of total adenosine deaminase (ADA) and its isoenzyme adenosine deaminase-2 (ADA2) were measured in 69 pleural effusion specimens of patients in different clinics of Armenia. The expressed correlation of the enzyme activity level with the tuberculosis pathology was revealed. The graphics of the sensitivity dependences

against (1 – specificity) for ADA and ADA2 calculated at different cutoff values of the enzymes activity were obtained. It is demonstrated that 34 U/L as a cutoff value for ADA activity, the parameter can be applied in diagnosis of tuberculous pleuritis with 100% specificity.

Литература

1. Баласанянц Г.С., Титаренко О.Т., Дьякова М.Н. Проблемы туберкулеза, 2001, 8, с. 46.
2. Марданян С.С., Саркисова Е.Г., Андреасян Н.А. и др. Проблемы туберкулеза, 2002, 2, с.37.
3. Титаренко О.Т., Соддатова Н.В. Проблемы туберкулеза, 1996, 3, с. 52.
4. Шароян С.Г., Антоян А.А., Марданян С.С. Биохимия, 1994, 59, с. 239.
5. Agarwal R.P., Sagar S.M., Parks R.E. Biochem. Pharmacol., 1975, 24 p. 693.
6. Aggeli C., Pitsavos Ch., Brili S. et al. Cardiology, 2000, 94, p. 81.
7. Barton RW, Goldshneider I. Mol. Cell. Biochem., 1979, 28, p.135.
8. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, 72, p.259.
9. Chaney A., Marbach E. Clin. Chem., 1961, 8, p.130.
10. Costine J., Glazer R.I., Jons D.G. Biochim. Biophys. Res. Com., 1978, 85, p.198.
11. Fischer D., Van der Weyden M.B., Snyderman R. et al. J. Clin. Invest., 1976, 2, p. 399.
12. Gorguner M., Cerci M., Gorguner I. Respiriology, 2000, 5 (4), p.321.
13. Murphy P.M., Brady T.J., Boggust W.A. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 188 (2), p.341.
14. Perez-Rodriguez E., Jimenez Castro D. Curr. Opin. Med., 2000, 6(4), p.259.
15. Perez-Rodriguez E., Perez Walton I.J., Sanches Hernandez J.J. et al. Respir. Med., 1999, 93, p. 816.
16. Schutte C.M., Ungerer J.P., Plessis H., Der Meyden C.H. J. Clin. Lab. Anal., 2001, 15(5), p. 236.
17. Sharma S.K., Suresh V., Mohan A., et al. Indian J. Chest Dis. Allied. Sci., 2001, 43, p. 149.
18. Shibagaki T., Hasegawa Y., Saito H. et al. J. Lab. Clin. Med., 1996, 127, p. 348.
19. Valdes L., Alvarez D., San Jose E. et al. Arch. Intern. Med., 1998, 159, p. 2017.
20. Van der Weyden M.B., Kelley W.N. J. Biol. Chem., 1976, 251, p. 5448.
21. Wolfenden R., Kaufman J., Macon J. Biochemistry, 1969, 8, p. 2409.