

Дьякова М.Е.

Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких

ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4

Цель исследования — комплексное изучение ферментов пуринового метаболизма в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках у больных туберкулезом легких. **Методика.** У 29 больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ) и 76 — впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках изучали активность ферментов пуринового метаболизма — аденозиндезаминазы (АДА) и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2), дипептидилпептидазы IV (DPPiV — CD26), экто-5'-нуклеотидазы (5'-НК). **Результаты.** У больных ФКТ и ИТЛ выявлены изменения пуринового метаболизма, выраженность и патофизиологическая значимость которых зависят от клинической формы туберкулеза, то есть от активности и давности специфического процесса. Снижение активности АДА мононуклеаров сопровождалось уменьшением экспрессии CD26 у больных ФКТ и ростом активности данной ectopeptidase у больных ИТЛ, то есть концентрации CD26 мононуклеаров и нейтрофилов связаны с формой туберкулеза легких. При обеих формах туберкулеза зарегистрировано увеличение уровня активности другого фермента пуринового метаболизма — 5'-НК. **Заключение.** В условиях ассоциирования АДА и CD26 при ИТЛ можно предположить усиление участия каждой из них в активации клеток, процессов пролиферации и продукции цитокинов. Низкий уровень CD26 иммунокомпетентных клеток при отсутствии связи их с активностью АДА характерен для больных ФКТ и отражает свойственную им недостаточность клеточного звена иммунитета. Можно предположить, что формирование комплексов АДА с ectopeptidase (CD26 и 5'-НК) при впервые выявленном ИТЛ обеспечивает баланс внеклеточный CD26_АДА/аденозин и внутриклеточный 5'-НК/аденозин и тем самым адекватный метаболизм иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: туберкулез; аденозиндезаминаза; 5'-нуклеотидаза; CD26; мононуклеары; нейтрофилы

Для корреспонденции: Дьякова Марина Евгеньевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патогенетических исследований, e-mail: marinadyakova@yandex.ru

Для цитирования: Дьякова М.Е. Особенности пуринового метаболизма у больных туберкулезом легких. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 61(3): 36—41.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.07.2015

Dyakova M.E.

Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis

Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg, Russian Federation

The purpose — comprehensive study of the purine metabolic enzymes in serum and immune cells in patients with pulmonary tuberculosis for the understanding of the pathogenesis of a specific lung disease.

Methods. The enzymes of purine metabolism (adenosine deaminase (ADA) and its isoenzymes (ADA-1 and ADA-2), dipeptidylpeptidase IV (DPPiV — CD26), ecto-5'-nucleotidase (5'-NC) in the blood and immune cells was studied in 29 and 76 patients with fibro-cavernous (FCPT) and infiltrative (IPT) pulmonary tuberculosis correspondingly.

Results. In patients found changes in purine metabolism, the severity and pathophysiological significance of which depend of clinical forms of tuberculosis, that is, from the gravity specific of the process. Reduced activity of ADA mononuclear cells was accompanied by a decrease in the expression of CD26 in patients with FCPT and the growth of the IPT ectopeptidase patients, that is, the concentration of CD26 mononuclear cells and neutrophils are associated with form of pulmonary tuberculosis. The increased levels of another enzyme purine metabolism — 5'-NC registered in both forms of pulmonary tuberculosis. **Conclusion.** In the context of the ADA and CD26 association with the IPT can assume increased participation of each of them in the activation of cell proliferation and cytokine production. Low levels of CD26 immune cells in the absence of their connection with the activity of ADA is typical for patients with FCPT and reflects their inherent failure of cellular immunity. We can assume that the formation of complexes with the ADA ectopeptidases (CD26 and 5'-NC) for newly di-

agnosed IPT provides a balance CD26_ADA extracellular / intracellular adenosine and 5'-NC / adenosine and thereby adequate metabolism of immunocompetent cells.

Keywords: tuberculosis, adenosine deaminase, ecto-5'-nucleotidase, CD26, mononuclears, neutrophils

For citation: Dyakova M.E. Features purine metabolism in patients with pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (3): 36—41. (in Russ).

For correspondence: Marina Y. Dyakova, Ph.D., Senior Research Worker, Laboratory of the Pathogenetic Researches St. Petersburg Research Institute of the Phthisio-Pulmonology of the Russia's Ministry of Health; ul. Polytechnicheskaya 32, St. Petersburg, 194064 Russia, e-mail: marinadyakova@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 31.07.2015

Введение

Ключевые ферменты пуринового метаболизма — аденозиндезаминаза (АДА) и экто-5'-нуклеотидаза (5'-НК) регулируют уровень аденозина, играющего важную роль в регуляции клеточного иммунитета [1]. В этой связи АДА рассматривается в качестве маркера напряженности иммунного ответа [2, 3]. Участие в нем принимают все три изофермента аденозиндезаминазы — АДА-1, АДА-2 и АДА — в комплексе с протеином (АДАср), идентифицированная как дипептидилпептидаза IV (DPPIV) и являющаяся высокоспецифичной сериновой протеиназой, присутствующей в качестве эктоэнзима на различных клетках [4]. Установлено, что DPPIV — активационный антиген CD26, способствующий регуляции продукции цитокинов за счет активации Т-лимфоцитов [5—7]. АДА регулирует уровень аденозина и дезоксиаденозина, конвертируя их в инозин и в дезоксиинозин соответственно. Если основная роль АДА-1 — деградация внутриклеточного аденозина и дезоксиаденозина и предохранение клеток от апоптоза [8], то АДА-2 и комплекса CD26-ADA — дезаминирование внеклеточного аденозина [9].

За образование аденозина из внеклеточных нуклеотидов ответственна экто-5'-НК, являющаяся важным антигеном иммунокомпетентных клеток, регулирующая их созревание и адгезию к эндотелию. Гидролиз фосфатидилинозитоловой связи сопровождается отделением 5'-НК от клетки и нарушением в лимфоцитах биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот и процессов созревания [10].

Изменение экспрессии DPPIV и 5'-НК изучалось при различных злокачественных опухолях, иммуноопосредованных нарушениях, остеопорозах, ревматоидных артритах и других воспалительных и инфекционных заболеваниях [11, 12]. Во фтизиопульмонологии исследования ограничивались изучением активности АДА и ее изоферментов АДА-1 и АДА-2.

Цель работы — комплексное изучение ферментов пуринового метаболизма в сыворотке крови и иммунокомпетентных клетках у больных туберкулезом легких.

Методика

Обследовано 105 больных туберкулезом легких: 29 — с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ; 19 мужчин и 10 женщин) в возрасте 22,0—64,0 лет и 76 — с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ; 33 мужчины и 43 женщины) в возрасте 16,0—65,0 лет. Выбор больных обусловлен тем, что ИТЛ — острая форма туберкулеза легких, а ФКТ — хроническая форма туберкулеза, конечная стадия неблагоприятного исхода ИТЛ при его естественном развитии или в результате неэффективного лечения. Обследование пациентов проводили до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии. В референсную (контрольную) группу были включены 30 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Активность АДА и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) в сыворотке крови и в лизатах клеток, получаемых путем повторного замораживания и оттаивания, определяли методом G.Giusti [13]. Уровни 5'-НК в сыворотке крови, CD26 (DPP IV) в сыворотке, мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (н) крови — с использованием иммуноферментных наборов Elisa (Ecto NT5E, «USCN», Китай и Human sCD26 Platinum ELISA, «eBioscience», Австрия).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Метрические показатели представлялись в виде среднего и ошибки среднего ($\bar{X} \pm m$), порядковые в виде минимум-максимум. Статистическую значимость различий метрических показателей оценивали с использованием непараметрического

Показатели пуринового метаболизма в сыворотке крови у больных ФКТ и ИТЛ

Показатели	Группы		
	Референсная	Больные ФКТ	Больные ИТЛ
АДА, ед./л	14,1 ± 0,24 14,1 (10,7—18,3)	19,34 ± 1,65* 17,5 (7,2—48,2)	18,8 ± 0,5* 17,3 (7,8—55,5)
АДА-1, ед./л	3,27 ± 0,16 3,33 (1,0—5,8)	2,71 ± 0,46* 2,05 (0—10,3)	2,9 ± 0,1* 2,7 (0—8,8)
АДА-2, ед./л	10,97 ± 0,24 11,2 (7,6—16,3)	16,63 ± 0,5* 15,2 (5,4—40,1)	15,9 ± 0,47* 14,4 (5,9—51,3)
CD26, нг/мл	710,0 ± 59,6 692,6 (500,0—875,0)	539,68 ± 75,11 452,9 (118,6—1675,9)	616,2 ± 44,48 535,0 (182,0—2000,0)
5'-НК, нг/мл	0,23 ± 0,09 0,06 (0—0,7)	0,91 ± 0,17* 0,8 (0—3,5)	0,94 ± 0,15* 0,73 (0,01—2,4)

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с референсной группой.

U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, проверка значимости результатов ранговых коэффициентов корреляции Спирмена на основе статистики Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У больных ФКТ и ИТЛ по сравнению с референсной группой отмечено однонаправленное изменение показателей АДА в сыворотке крови: рост активности АДА за счет увеличения АДА-2 при снижении активности АДА-1 (табл. 1). И как следствие этого, выявлено нарушение соотношения изоферментов в общей активности АДА: снижение процентного содержания АДА-1 и увеличение АДА-2 (рис. 1).

В мононуклеарах больных обеих групп активность АДА была снижена за счет уменьшения активности АДА-1мн (рис. 2). При этом при ФКТ активность АДА-1мн определялась в 1,4 раза ниже, чем при ИТЛ. Активность АДА-2мн и доля изоферментов АДА-1мн и АДА-2мн в общей активности АДАмн у больных ФКТ и ИТЛ были в пределах референсных значений, то есть сохранялось динамическое рав-

новесие изоферментов аденозиндезаминазы в мононуклеарах при обеих формах туберкулеза легких.

В нейтрофилах активность АДА при обеих формах туберкулеза регистрировалась в пределах референсных значений. Это относится и к активности АДА-1н, АДА-2н и их доле в общей активности АДА нейтрофилов у больных ФКТ. Напротив, у больных ИТЛ выявлено разнонаправленное изменение активности изоферментов: снижение активности АДА-1н и %АДА-1н при росте АДА-2н и %АДА-2н. Причем, у больных ИТЛ в 1,8 раза чаще, чем у больных ФКТ регистрировалась активность АДА-2н > 0 и как следствие этого доля изофермента АДА-1 в общей активности АДА нейтрофилов была в 1,1 раза ниже, а АДА-2н, напротив, в 1,7 раза выше. То есть при ИТЛ в нейтрофилах было выявлено перераспределение изоферментов, в сторону роста АДА-2.

Уровень CD26 в сыворотке (растворимая форма эктопептидазы) у больных ФКТ и ИТЛ был в пределах референсных значений. При том, что экспрессия данной эктопептидазы в мононуклеарах и нейтрофилах у больных ФКТ и ИТЛ была разнонаправ-

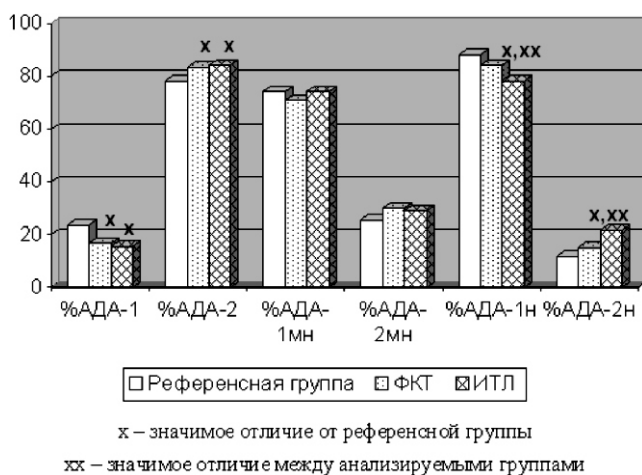


Рис. 1. Доля изоферментов в общей активности АДА в сыворотке и иммунокомпетентных клетках крови у больных ФКТ и ИТЛ.

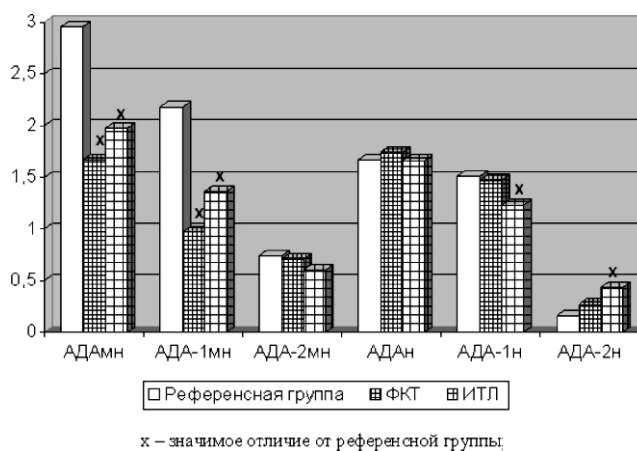


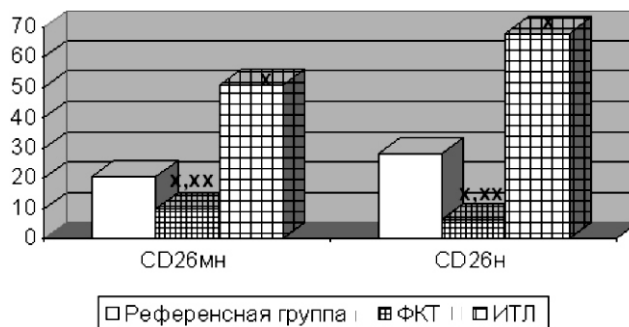
Рис. 2. Внутриклеточная активность аденозиндезаминазы в анализируемых группах.

ленной (рис. 3): снижение CD26 при ФКТ и рост — при ИТЛ. У больных ФКТ уровень CD26 в мононуклеарах и нейтрофилах регистрировался соответственно в 5,2 и 10,7 раза ниже, чем при ИТЛ ($p = 0,0004$ и $p = 0,00003$).

Уровень 5'-НК в сыворотке значимо превышал референсные значения при обеих формах туберкулеза легких.

Таким образом, активность АДА-1-мн, %АДА-1н, %АДА-2н, концентрация CD26 мононуклеаров и нейтрофилов зависели от формы туберкулеза. Так как в активированных клетках повышается процент клеток, экспрессирующих CD26 и АДА [14], то можно предположить, что иммунокомпетентные клетки при впервые выявленном ИТЛ активированы в большей степени, чем при хроническом течении специфического процесса.

От формы туберкулеза зависели и результаты корреляционного анализа (табл. 2): у больных ИТЛ отмечена согласованность показателей пуринового метаболизма, регулирующих уровень нуклеотидов, ответственных за функциональную активность фагоцитирующих клеток. Только при ИТЛ выявленные ассоциации между %АДА-1 сыворотки и CD26 мн, а также между %АДА-1мн и CD26 мн ($r = 0,24$; $p = 0,06$) наводят на мысль о возможности образования комплекса внеклеточного домена в мононуклеарах. И, возможно, именно образованием данного домена можно объяснить снижение активности внеклеточной АДА-1 (экто-АДА-1) при ИТЛ. Но у больных ФКТ, у которых не выявлено комплексообразования АДА-1 (сыворотки и/или мононуклеаров) с CD26, также зарегистрировано уменьшение активности АДА-1 сыворотки. CD26 — сенсор экто-АДА, экспортируемой из клетки или освобождаемой после гибели клетки [14]. И, возможно, при ФКТ именно после гибели (лизиса) клеток появилась экто-АДА-1, которая затем могла образовать комплекс с CD26 [15]. Интересно отметить зарегистрированные при ИТЛ отрицательные связи между



x — значимое отличие от референсной группы,
 xx — значимое отличие между анализируемыми группами

Рис. 3. Уровень CD26 иммунокомпетентных клеток в анализируемых группах

CD26мн и АДА-2мн, %АДА-2мн ($r = 0,26$; $p = 0,04$; $r = 0,25$; $p = 0,05$ соответственно), которые можно прокомментировать как невозможность ассоциированности данных показателей, потому что АДА-2 может связываться с различными типами клеток через протеогликаны или более специфичные аденозиновые рецепторы [16].

При ИТЛ полученная отрицательная связь между уровнем CD26н и активностью АДАН, может рассматриваться как несбалансированность этих характеристик пуринового метаболизма в нейтрофилах. Но при этом регулирование уровня аденозина в нейтрофилах у больных ИТЛ, возможно, осуществляется 5'-НК, судя по корреляции между данной эктопептидазой и АДАН, то есть при ИТЛ сохранялось равновесие между поступлением аденозина и его дезаминированием. Напротив, при ФКТ выявленная положительная взаимосвязь между уровнем 5'-НК и DRP1V/CD26н, с одной стороны, указывает на синергизм эктопептидаз в регуляции концентрации аденозина в нейтрофилах, но с другой стороны, наводит на мысль о недостаточной активности 5'-НК, что и

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа у больных анализируемых групп

Пары признаков		Группы больных	
		ФКТ	ИТЛ
АДА-1/АДА	CD26мн	—	$r = 0,27$; $p = 0,03$
АДА-2	АДА-2мн/АДАмн	—	$r = 0,34$; $p = 0,003$
АДАН	5'-НК	—	$r = 0,47$; $p = 0,03$
АДАН	CD26н	—	$r = 0,41$; $p = 0,03$
CD26	CD26мн	—	$r = 0,25$; $p = 0,046$
CD26мн	CD26н	—	$r = 0,71$; $p = 0,00...$
5'-НК	CD26н	$r = 0,55$; $p = 0,0045$	—

подтверждается отрицательной связью между АДА-1н/АДАн и 5'-НК ($r = 0,64$; $p = 0,008$). Появление растворимой формы может быть частично связано с протеолитическим расщеплением и/или секретией клеточной CD26 [12]. В свете этого, установленная у больных ИТЛ отрицательная взаимосвязь между CD26 сыворотки и мононуклеаров может свидетельствовать о возможности происхождения растворимой формы эктопептидазы вследствие секреции из мононуклеаров. Поскольку при ФКТ данная связь отсутствует при близком уровне CD26 сыворотки у больных обеих групп, можно предположить вероятность секреции растворимой формы эктопептидазы всеми клетками, на мембране которых экспрессируется CD26 при ФКТ [5]. Наконец, больных ИТЛ отличает наличие межклеточного взаимодействия между мононуклеарами и нейтрофилами, отражением чего является связь между уровнями CD26мн и CD26н.

АДА-2 экспрессируется моноцитами/макрофагами в ответ на инвазию патогенов, в места с высокой концентрацией аденозина и низким рН [15, 16]. И только при ИТЛ выявлена связь между %АДА-2мн и АДА-2 сыворотки, отражающая выход АДА-2 из мононуклеаров в ответ на инвазию *Mycobacterium tuberculosis* и повышение уровня внеклеточного аденозина. Это подтверждается слабой корреляцией между АДА-2 и числом моноцитов ($r = 0,28$; $p = 0,0008$). У больных ФКТ по отсутствию связей между показателями АДА сыворотки и мононуклеаров и по отрицательной корреляционной зависимости между АДА-2/АДА и числом моноцитов ($r = 0,52$; $p = 0,00074$) можно предположить, что рост активности внеклеточной АДА-2 происходит вследствие разрушения (лизиса) макрофагов.

Таким образом у больных ФКТ и ИТЛ выявлены изменения пуринового метаболизма, выраженность и патофизиологическая значимость которых зависят от клинической формы туберкулеза, то есть от степени активности и давности специфического поражения, развития фиброзных изменений, ограничивающих казеозные участки. Снижение активности АДА мононуклеаров сопровождалось уменьшением экспрессии CD26 у больных ФКТ и ростом данной эктопептидазы у больных ИТЛ, то есть концентрации CD26 мононуклеаров, а также и нейтрофилов связаны с формой туберкулеза легких. При обеих формах туберкулеза зарегистрировано увеличение уровня другого фермента пуринового метаболизма — 5'-НК.

В условиях ассоциирования АДА и CD26 при острой форме туберкулеза можно предположить усиление участия каждой из них в активации клеток, процессов пролиферации и продукции цитокинов. Низкий уровень CD26 иммунокомпетентных клеток

при отсутствии связи их с активностью АДА характерен для больных с хроническим течением специфического процесса и отражает функциональное истощение иммунокомпетентных клеток, недостаточность клеточного звена иммунитета. Можно предположить, что формирование комплексов АДА с эктопептидазами (CD26 и 5'-НК) при впервые выявленном ИТЛ обеспечивает баланс внеклеточный CD26 АДА/аденозин и внутриклеточный 5'-НК/аденозин и тем самым адекватный метаболизм иммунокомпетентных клеток. А отсутствие данных комплексов при хронической форме туберкулеза легких отражает дисбаланс между поступлением аденозина и его дезаминированием, что согласуется не только с остро выраженным специфическим процессом, но и с нарушениями метаболизма иммунокомпетентных клеток.

References

- Zanini D., Schmatz R., Pimentel V.C., Gutierrez J.M., Maldonado P.A., Thome G.R. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother.* 2012; 66(1): 40-5.
- Knoring B.E., Titarenko O.T., Sakharova I.Ya., Dyakova M.E., Loginova G.P. Correlation of cytokine production and activity of adenosine deaminase in pulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk. i Bol. Legkikh.* 2000; 3: 38-1. (in Russian)
- Titarenko O.T., Dyakova M.E., Perova T.L., Ryasnyanskaya T.B. Activity of adenosine deaminase and its isoenzymes in patients with different forms of tuberculosis. *Probl. Tuberk. i Bol. Legkikh.* 2002; 3: 43-5. (in Russian)
- Cordero O.J., Salgado F.J., Fernandez-Alonso C.M., Herrera C., Lluís C., Franco R. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. of Leuk. Biol.* 2001; 70: 920-30.
- Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan W. CD 26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54: 249-64.
- Weihofen W.A., Liu J., Reutter W., Saenger W., Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 43330-35.
- Pacheco R., Lluís C., Franco R. Role of CD26-adenosine deaminase interaction in T cell-mediated immunity. *PNAS.* 2005; 24 (2): 235-45.
- Franco R., Pacheco R., Gatell J.M., Gallart T., Lluís C. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.* 2007; 27: 495-509.
- Eckle T., Koeppen M., Eltzsching H.K. Role of extracellular adenosine in acute lung injury. *Physiology.* 2009; 24 (5): 298-306.
- Hunsucker S.A., Mitchell B.S., Spychala J. The 50-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* 2005; 107: 1-30.
- Schetinger M.R.C., Morch V.M., Bonan C.D., Wyse A.T.S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors.* 2007; 31: 77-98.

12. Eric-Nikolic A., Matic I.Z., Dordevic M., Milovanovic Z., Markovic I., Dzodic R. et al. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology*. 2011; 216: 942-46.

13. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer H. ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974: 2. 1092-99.

14. Martin M., Huguet J., Centelles J.J., Franco R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. *J. Immunol.* 1995; 155: 4630 — 43.

15. Hashikawa T., Takedachi, Terakura M., Yamada S., Thompson L.F., Shimabukuro et al. Activation of adenosine receptor on gingival fibroblasts. *J.Dent Res.* 2006 August; 85(8): 739-44.

16. Zavialov And.V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov Ant.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. of Leukocyte Biology*. 2010; 88 (2): 279-90.

17. Zavialov A.V., Engstrom A. Human ADA-2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase. *Biochem. J.* 2005; 391: 51-7.