Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(64), 2012

ԱԴԵՆԻՆԸ ԵՎ ԱԴԵՆՈԶԻՆԸ ԴԵԶԱՄԻՆԱՑՆՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՈՂՋ ԵՎ ՏՈՒԲԵՐԿՈՒԼՅՈԶՈՎ ՀԻՎԱՆԴ ՄԱՐԴԿԱՆՑ ԱՐՅԱՆ ՄԵՋ

Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Մ.Հ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Ն.Ն. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ,Գ.Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենսաքիմիայի ամբիոն
nn.hayrapetyan@gmail.com

Բժշկության դժվարին խնդիրներից է թոքերի տուբերկուլյոզի ճանաչողական տարբերակումը և ախտորոշումը: Հիվանդության բացահայտման համար առաջարկված են ախտորոշման տարբեր մեթոդներ: Մեր կողմից հետազոտվող ֆերմենտները՝ ադենազը, ադենոզինդեզամինազը նույնպես կարող են ծառայել տուբերկուլյոզի բացահայտման ճշգրիտ գործոն, քանի որ հիվանդության դեպքում արյան էրիթրոցիտներում նշված ֆերմենտների ակտիվությունը զգալի բարձրանում է:

Ադենազ - ադենոզինդեզամինազ - էրիթրոցիտներ - տուբերկուլյոզ

Диагностика и отличительное распознавание туберкулеза легких являются трудной задачей для медиков. Для выявления болезни предложены различные методы диагностики. Исследуемые нами ферменты (аденаза и аденозиндезаминаза также могут служить фактором диагностирования туберкулеза, поскольку в эритроцитах крови при болезни наблюдается значительное повышение активности данных ферментов.

Аденаза - аденозиндезаминаза - эритроциты - туберкулез

The distinctive recognization of tuberculosis is a hard problem for doctors. There are many different methods of diagnostics of disease identification. The enzymes investigation, namely adenase and adenosine deaminase, can be used as factors of diagnostics of lung tuberculosis, since the increased activities of these enzymes were observed in blood erythrocytes during this disease.

Adenase - adenosine deaminase - erythrocytes - tuberculosis

Հայտնի է, որ բջիջների կենսագործունեությունը ուղեկցվում է ամոնիակառաջացմամբ, ինչը ազոտպարունակող միացությունների կատաբոլիզմի հետևանք է: Ամոնիակի աղբյուր են հանդիսանում նաև նուկլեինաթթուները: Նուկլեինաթթուների կատաբոլիզմը իրականացվում է նուկլեազներով, նուկլեոզիդազներով, նուկլեոտիդազներով: Վերջին ֆերմենտների ազդեցությամբ գոյացած ազոտային հիմքերը դեզամինացվում են սպեցիֆիկ ֆերմենտներով, դրանցից են ադենինդեզամինազը, ադենոզինդեզամինազը: Երկար ժամանակ տիրում էր այն կարծիքը, որ ադենազը բնորոշ է ստորակարգ օրգանիզմներին, իսկ բարձրակարգ օրգանիզմներում գործում է ադենոզինդեզամինազը [10]: Սակայն վերջին տարիների հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ադենազը ունի բավականին լայն տարածվածություն և հանդիպում է նաև բարձրակարգ օրգանիզմներում [1]: Սակայն, բարձրակարգ օրգանիզմներում ադենինի դեզամինացման հարցերը դեռևս բավարար ուսումնասիրված չեն: Եղած տվյալները վկայում են, որ ադենազը հայտնաբերվել է մարդու արյան շիճուկում նաև զանազան պաթոլոգիաների դեպքում (ուռուցքներ, լեյկեմիա, աթերոսկլերոզ) [5]: Սա հնա բավորություն է տալիս ֆերմենտի ակտիվության որոշումը կիրառել կլինիկայում, որպես դիագնոստիկ թեստ:

Ֆերմենտի ակտիվության փոփոխություն է նկատվում հեպատիտով, ցիրոզով, ինֆեկցիոն մոնոնուկլեոզով տառապող հիվանդների մոտ, տարբեր օրգանների տուբերկու-լյոզային հիվանդությունների դեպքում [12]: Մեր կողմից հետազոտվել է տուբերկուլյոզով հիվանդների արյան պլազման, էրիթրոցիտար զանգվածը: Մինչ մեզ ցույց է տրվել, որ արյան ձևավոր տարրերում նշված ֆերմենտը առկա է և նրա ակտիվությունը ընկճվում կամ բարձրանում է կախված հիվանդությունից [5]: Մասնավորապես, խրոնիկ լիմֆոլեյկոզի, խրոնիկ միելոլեյկոզի, սուր լեյկոզի ժամանակ ադենազի ակտիվությունը էրիթրոցիտներում ընկնում է, մինչ դեռ նշված հիվանդությունների դեպքում թրոմբոցիտներում ֆերմենտը ցուցաբերում է մոտ 20 անգամ բարձր ակիվություն [3]: Նույն օրինաչափությունը նկատվել է նաև հեմոբլաստոզով տառապող կապիկների մոտ [4]: Ավելի ցայտուն տվյալներ են ստացվել ադենոզինդեզամինազի վերաբերյալ: 1972թ. բացահայտվել է, որ իմունոդեֆիցիտի ժամանակ երևան են գալիս պուրինային փոխանակության ֆերմենտատիվ խախտումներ, մասնավորապես փոփոխվում է լայն տարածում ունեցող ադենոզինդեզամինազ ֆերմենտի ակտիվությունը [8,13]: Այս ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում է գրանցվում ուռուցքով, լեյկեմիայով, աթերոսկլերոզով տառապող հիվանդների մոտ [11]: Առանձնապես տպավորիչ են տուբերկուլյոզի ժամանակ ադենոզինդեզամինազի կրած փոփոխությունները [6]: Ֆերմենտի ակտիվության փոփո-խությունը (բարձրանում է մոտ 3 անգամ) կիրառվում է որպես տուբերկուլյոզային պլևրիտի վաղ ախտորոշման հավաստի հատկանիշ և բուժման ընթացքի վերահսկումը թուլատրող միջոց [9]: Ադենոզինդեզամինազը առաջարկվել է, որպես պլևրայում, պերիկարդում, որովայնային հեղուկներում տուբերկուլյոզի բացահայտման օգտակար փոխարինող մարկեր [14]: Որոշ ուսումնասիրություններ հաստատել են ադենոզինդեզամինազի ակտիվության որոշման կարևորությունը ցիրոզով հիվանդների մոտ որովայնային տուբեր-կուլյոզի դիագնոստիկայի առումով, քանի որ այս դեպքում հիվանդության կլինիկական պատկերը տարբերվում է [15]: Գրականության մեջ եղած տվյալները վկայում են, որ չկան պաթոլոգիաների դեպքում ադենոզինդեզամինազին և ադենինդեզամինազին վերաբերող միաժամանակ իրականացվող հետազոտություններ: Բացը լրացնելու նպատակով, մենք կատարել ենք հետազոտություններ ուղղված ադենազի և ադենոզինդեզամինազի ակտիվության որոշմանը առողջ և տուբերկուլյոզով ախտահարված մարդկանց արյան պլազմայում և էրիթրոցիտներում զուգահեռաբար և ստացված տվյալները ամփոփել ենք այս հոդվածում: Կատարվել են ուսումնասիրություններ նվիրված վերը նշված ֆերմենտների բացահայտմանը և կրած փոփոխություններին:

Նյութ և մեթոդ: Օբյեկտ են հանդիսացել առողջ և տուբերկուլյոզով ախտահարված մարդկանց արյան պլազման և էրիթրոցիտար զանգվածը: Արյունը վերցվել է թոքախտային բաժանմունքից: Որպես հակակոագուլյանտ օգտագործվել է Na-ցիտրատի լուծույթ, որը ավելացվել է արյանը 1:9 հարաբերությամբ: Էրիթրոցիտների սուսպենզիայի հոմոգենատները պատրաստվել են K- ֆոսֆատային բուֆերում, pH=7,4: Հոմոգենատներն ինկուբացվել են 37°C, 90 րոպե տնողու-թյամբ: Ռեակցիան կանգնեցվել է 20% ԵՔՔ-ով: Ամոնիակի քանակությունը որոշվել է միկրոդի-ֆուզիոն եղանակով [2]:

Արդյունքներ և քննարկում: Մեր կողմից կատարված աշխատանքների նպատակն էր պարզել ադենոզինդեզամինազի և ադենազի վարքագիծը և որոշ հատկությունները առողջ և տուբերկուլյոզով հիվանդ մարդկանց արյան պլազմայում և էրիթրոցիտներում:

Աղ. 1-ում ցույց են տրված երկու ֆերմենտների ակտիվության որոշման արդյունք ները առողջ և հիվանդ մարդկանց արյան պլազմայում և էրիթրոցիտներում: Տվյալները վկայում են, որ ադենազային ակտիվությունը հիվանդների արյան պլազմայում որոշ չափով նվազում է (19,28 մկմ և 16,6 մկմ համապատասխանաբար): Ի տարբերություն արյան պլազմայի, էրիթրոցիտներում հիվանդության դեպքում ադենազը ցուցաբերում է 3 անգամ ավելի բարձր ակտիվություն (20,09 մկմ և 62,54 մկմ 1գ հյուսվածքում համապատասխանաբար): Ինչ վերաբերում է ադենոզինդեզամինազին, ապա այս ֆերմենտը և առողջ և հիվանդ օրգանիզմների արյան պլազմայում ցուցաբերում է գրեթե նույն ակտիվությունը (23,59 մկմ և 22,87 մկմ համապատասխանաբար), սակայն հիվանդների էրիթրոցիտնե-րում ֆերմենտը 3 անգամ ավելի ակտիվ է (69,8 մկմ և 184,53 մկմ): Այսինքն, որոշակիորեն կարելի է ասել, որ տուբերկուլյոզի ժամանակ հետազոտվող ֆերմենտների ակտիվությունը էրիթրոցիտներում կտրուկ բարձրանում է: Հետազոտությունների հաջորդ

փուլում մենք էրիթրոցիտների հոմոգենատը ցենտրիֆուգել ենք 20 րոպե, 9000 g-ի պայմաններում և պարզել ուսումնա-սիրվող ֆերմենտների ներբջջային լոկալիզացիան:

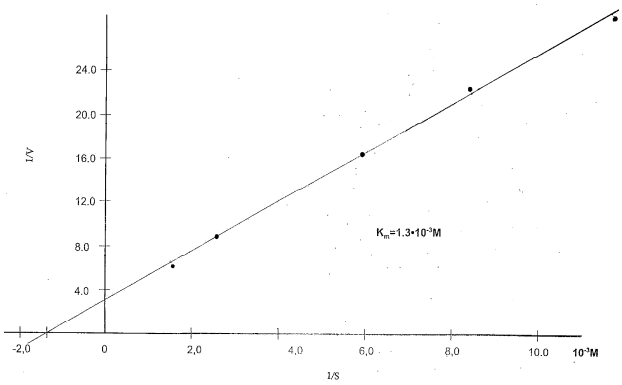
Աղյուսակ 1. Ադենինի և ադենոզինի դեզամինացումը առողջ և թոքախտով հիվանդ մարդկանց արյան հոմոգենատներում (մկմ 1 գ հյուսվածքում)

Ֆերմենտներ	Էրիթրոցիտներ		Լեյկոցիտներ		Արյան պլազմա	
	առողջ	հիվանդ	առողջ	հիվանդ	առողջ	հիվանդ
Ադենին-դեզամինազ	20.09±0.8	62.54±1.02	9.54±047	-	19.28±0.99	16.66±1.03
Ադենոզին-դեզամինազ	69.81±2.01	184.53±2.2	19.24±0.83	-	23.59±0.1	22.87±0.72

Աղյուսակ 2. Առողջ մարդու արյան էրիթրոցիտներում ադենոզինդեզամինազի և ադենինդեզամինազի ներբջջային լոկալիզացիան
(մկմ NH_3 1գ հյուսվածքում, 9000 g, 20 րոպե)

Ֆերմենտներ	Էրիթրոցիտներ		
	Հոմոգենատ	նստվածք	վերնստվածք
Ադենինդեզամինազ	20.4±0.20	0.11±0.02	20.15±0.27
Ադենոզինդեզամինազ	68.40±0.92	0.04	67.0±0.68

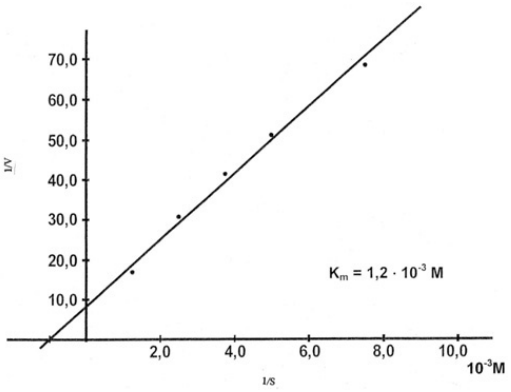
Աղ. 2-ը վկայում է, որ և ադենազը և ադենոզինդեզամինազը բարձր ակտիվություն ցուցաբերում են վերնստվածքում, այսինքն ունեն ցիտոպլազմատիկ լոկալիզացիա: Ֆերմենտների հատկությունների ուսումնասիրման նպատակով իրականացրել ենք նաև էրիթրոցիտների հոմոգենատների վերնստվածքի հելֆիլտրացիա սեֆադեքս G-150-ով: Ֆերմենտները ենթարկվել են մասնակի մաքրման, բացահայտվել են ֆերմենտների իզոենզիմները: Էրիթրոցիտների վերնստվածքի հելֆիլտրացիայի կորագիծը [նկ.3,4] ցույց է տալիս, որ արտահայտվել է 2 գագաթ՝ ցածրամոլեկուլյար և բարձրամոլեկուլյար սպիտակուցների ձևով, որոնք էլ դրսևորված են 2 իզոենզիմներով: Ինչ վերաբերում է ֆերմենտի սուբստրատի հանդեպ ունեցած խնամակցությանը, ապա պետք է նշել, որ մեր տվյալները չեն համապատասխանում գրականության տվյալներին:



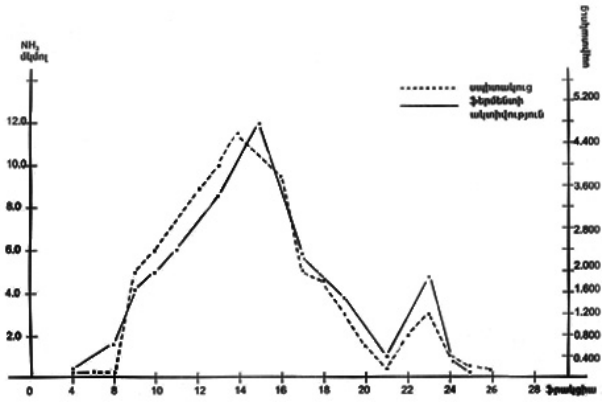
Նկ.1. Առողջ մարդու արյան էրիթրոցիտների ադենինդեզամինազի Լայնուիվեր-Բերկի կորը:

Ինչպես երևում է (նկ.1,2) առողջ էրիթրոցիտներից անջատված ադենազը և ադենոզինդեզամինազը ցուցաբերում են բավականին բարձր խնամակցություն իրենց սուբստրատների նկատմամբ՝ ադենազ-K_m=1,3x10^{-3}M, ադենոզինդեզամինազ K_m=1,2x10^{-3}M: Սակայն գրականության տվյալները վկայում են, որ ադենոզինդեզամինազը մարդու էրիթրոցիտներում ներկայացված է K_m=0,25x10^{-3}M արժեքով, այսինքն խնամակցությունը առավել բարձր է [7]: Այս ամենը լրացուցիչ վկայություն է կատարվող հետազոտությունների զարգացման օգտին: Հոդվածում բերված նյու-

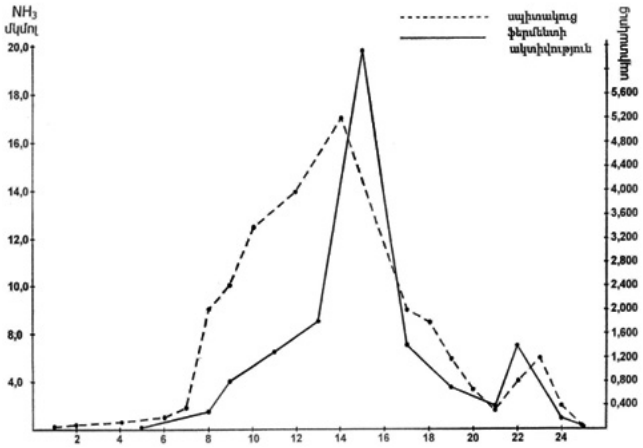
թը արժեքավոր տեղեկություն է տալիս տվյալ ֆերմենտների վերաբերյալ: Եվ այս ֆերմենտների հայտնաբերումը կոնկրետ տուբերկուլյոզի դեպքում հետաքրքրու թյուն է ներկայացնում էնզիմադիագնոստիկայի տեսակետից: Սակայն ադենազի և ադենոզինդեզամինազի ակտիվությանը, հատկություններին, փոխանակության ճանապարհներին վերաբերող շատ հարցեր մնում են չբացահայտված: Եվ նպատակահարմար է հետազոտությունները այս ուղղությամբ շարունակել:



Նկ.2. Առողջ մարդու արյան էրիթրոցիտների ադենոզինդեզամինազի Լայնուիվեր-Բերկի կորը:



Նկ.3. Առողջ մարդու արյան էրիթրոցիտների ադենինդեզամինազի իզոէնզիմային սպեկտրը



Նկ.4. Առողջ մարդու արյան էրիթրոցիտների ադենոզինդեզամինազի իզոէնզիմային սպեկտրը

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Давтян М.А., Хачатрян М.А.* Адениндезаминазная активность в различных биологических объектах, МАНЕБ, 9, вып.3, с.44-46, 2004
2. *Силакова А.* Микрометод определения аммиака глютамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах, Вопросы мед. химии, *5*, с.538, 1962.
3. *Соковнина Я.М.* Ингибитор аденазы тромбоцитов здоровых людей, Вопросы мед. химии, *XX*, в. 3, с.425-427, 1977.
4. *Соковнина Я.М., Дебов С.С.* Аденаза тромбоцитов крови здоровых обезьян и обезьян с разной выраженностью гемобластоза, Бюллетень эксперим. биолог. и медиц., *11*, с. 555-556, 1977.
5. *Соковнина Я.М.* Аденинаминогидролаза: распространение, свойства, новые аспекты изучения, Вопросы мед. химии, *28*, 2, с. 9-20, 1982.
6. *Титаренко О.Т.* Перспективность определения активности аденозиндезаминазы в биологических жидкостях при туберкулезе, Проблемы туберкулеза, М., *5*, с.52-54, 1996.
7. *Agarwal R.P. et al,* ADA from human erythrocytes, Methods Enzymol., *67,* p.502-507, 1978.
8. *Amicosante M.,* Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection; guidelines and cost effectiveness studies, New Microbiologica, *33*, 93-107, 2010.
9. *Banales J.J., Pineda P.R.,* Searching for Tuberculosis in the pleural space, Chest Physicians, *116,* 1, 3-5, 1999.
10. *Esmond R. Long,* On the presence of adenase in the human body, J. Biol. Chem., *15*, 449-461, 1913.
11. *Gakis C., Naitana A.* ADA activity in the diagnosis of infectious diseases, Infect Med., p.219-232, 1994.
12. *Giblett E.R.* Recombinanat Human adenosine deaminase/ADA, Lancet 2, 1067, 1972
13. Hillebrand P.J. Ascitic fluid ADA insensitivity in detecting tuberculous peritonitis in the US, Hepatology, *24*, 1408-1412, 1996.
14. *Mathur P.C., Tiwari K.K.,* Diagnostic value of ADA activity in tubercular serositis, Indian J.Tuberc., *53*, p.30-32, 2006.
15. *Riguelme A.J..* Value of ADA in ascitic fluid for the diagnosis tuberculous peritonitis, J. Clin. Gastroenterol., *40*, p.705-710, 2006.

Ստացվել է 07.09.2011