

УДК: 575.224.234:574.962

*К. И. Павлов*

**Исследование активности цитидиндезаминазы с использованием гемцитабина в качестве субстрата**

*УО Белорусский государственный медицинский университет, город Минск,  
Республика Беларусь*

**Резюме**

Активность фермента цитидиндезаминазы представляет показатель, отражающий индивидуальные особенности иммунного ответа на инфекцию.

Цель исследования – оценить активность цитидиндезаминазы в отношении атипичного нуклеозида – гемцитабина. Для 80-ти проб была исследована сравнительная активность цитидиндезаминазы по отношению к гемцитабину в сравнении с цитидином, используя стандартные объёмы и микропланшеты. Активность цитидиндезаминазы в отношении гемцитабина сопоставима с активностью в отношении стандартного субстрата – цитидина. Для проб с высоким значением активности абсолютные значения в отношении гемцитабина даже выше, чем цитидина.

**Ключевые слова:** цитидиндезаминаза, хронический вирусный гепатит С, гемцитабин, индофенольная колориметрическая реакция

*K. I. Pavlov*

**Cytidine deaminase activity measurement using gemcitabine as substrate**

*Belorussian state medical university, Minsk, Belarus*

**Abstract**

Cytidine deaminase enzyme activity is an high individualized indicator for the immune response to infection. The purpose of research was - to evaluate the activity of cytidine deaminase using atypical nucleoside – gemcitabine as substrate. Enzyme activity was measured for 80 plasma samples to compare cytidine versus

gemcitabine using standard volumes and microplates. So cytidine deaminase activity against gemcitabine comparable activity against the standard substrate - cytidine. For samples with high absolute values of activity gemcitabine is even higher than the cytidine.

**Key words:** Cytidine deaminase, chronic HCV infection, gemcitabine, indophenol colorimetric test.

УДК: 575.224.234:574.962

*К. И. Павлов*

**Исследование активности цитидиндезаминазы с использованием гемцитабина в качестве субстрата**

*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», город Минск, Республика Беларусь*

**Введение**

В 2010-11 гг. при оценке результатов противогриппозной иммунизации среди здоровых добровольцев была выявлена группа испытуемых со сниженным протективным титром. Предполагалось, что данное явление может быть связано не с малым уровнем специфических антител, а с меньшей их аффинностью, при том же количестве [1]. Таким образом, в пределах, в целом, достаточного гуморального иммунного ответа популяция может быть гетерогенной по степени аффинности протективных антител, что не сопровождается выраженным иммунодефицитом, но может определять предрасположенность к тяжёлому течению инфекции, возможным осложнениям. Была выдвинута гипотеза о том, что для ряда инфекций, включая гриппозную, иммунонедостаточная популяция может содержать «скрытую» группу риска тяжёлого течения заболевания и летальных осложнений [2]. Аффинность антител напрямую связана с количеством и качеством соматических гипермутаций в генах вариабельных участков тяжёлых цепей иммуноглобулинов. Соматический мутагенез представляет собой многоступенчато регулируемый процесс единичных нуклеотидных замен в, так называемых, «горячих точках» вариабельных участков тяжёлых цепей генов иммуноглобулинов. В последствии, на основе сродства образуемых рецепторов с антигеном происходит положительная селекция В-лимфоцитов. На качество и интенсивность соматического мутагенеза влияют два основных фактора –

соматическая рекомбинация генов иммуноглобулинов и активность фермента Activation-induced cytidine deaminase (активированная индукцией цитидиндезаминаза, или просто цитидиндезаминаза), непосредственно осуществляющий соматический мутагенез. Именно эти два процесса могут быть мишенями для ряда вирусных патогенов, способных моделировать силу и интенсивность иммунного ответа, вызывая либо иммунодефицит, либо, напротив, на определённой стадии патогенеза провоцируя поликлональную активацию Т и В-лимфоцитов [3]. Подобные опции описаны у вирусов гриппа, гепатита С, вируса Эпштейна-Барр, вируса иммунодефицита человека, бактерии *Helicobacter pylori*. Так инфекционный мононуклеоз, вызываемый вирусом Эпштейна-Барр, сопровождается часто клональной экспансией мононуклеарных лейкоцитов. Предполагается, что прямая ингибиция вирусом активности цитидиндезаминазы и соматических гипермутаций приводит к нарушению селекции зрелых В-лимфоцитов (у которых число соматических гипермутаций в норме велико), что как раз и способствует поддержанию в периферической крови мононуклеарного клона, необходимого вирусу для размножения. Цитидиндезаминаза обладает прямой антиретровирусной активностью при условии высокого внутриклеточного содержания рибонуклеопротеидов и свободной РНКазы. При ВИЧ-ассоциированной активации Т-клеточного ростка происходит образование внутривирионных комплексов, содержащих клеточную цитидиндезаминазу. Блокировка интравирионными белками данного механизма приводит к резкому повышению вирусной нагрузки. Течение хронического гепатита С сопровождается повышением титров криогаммаглобулинов, тяжёлые цепи которых синтезируются с отличных от нормы по нуклеотидной последовательности V(D)J-рекомбинантов. Онкогенность *Helicobacter pylori* может быть связана с нарушением цитидиндезаминаза-зависимых репарации ДНК и реметилирования из-за хронического воспаления гастрального эпителия.

Таким образом, возможность оценить состояние механизмов, определяющих соматический мутагенез генов иммуноглобулинов является крайне важной задачей как для диагностики иммунного статуса пациента с вирусной инфекцией, так и для понимания стратегии реализации генома ряда вирусных патогенов.

Активность цитидиндезаминазы стандартно исследуется с помощью индофенольного колориметрического теста, субстратом для которого является раствор минорного нуклеозида цитидина. В то же время, в фармакологии подробно описана биodeградация крайне схожего по строению атипичного нуклеозида – гемцитабина.



*Рисунок 1 – Схожесть строения цитидина и гемцитабина и группа, подвергающаяся дезаминации*

Гемцитабин – противоопухолевый препарат, схожий по строению с цитидином и имеющий свободную NH<sub>2</sub>-группу, дезаминируемую цитидиндезаминазой [4].

**Целью** данного исследования, таким образом, было повысить диагностическую значимость исследования фермента цитидиндезаминазы, за счёт использования в качестве субстрата раствора гемцитабина.

## **Материалы и методы**

**Учёт ферментативной активности.** Активность цитидиндезаминазы измерялась в индофенольной колориметрической реакции используя стандартный раствор цитидина [5]. Для сравнения был использован раствор атипичного нуклеозида гемцитабина в той же концентрации (10,5 ммоль/л). Использованы следующие соотношения реакционных компонентов: 200 мкл субстратного раствора: 5 мкл исследуемой сыворотки: 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора: 600 мкл основного раствора гипохлорита. Реакция проходила при 37 °С в пробирке типа Эппендорф, объёмом 1,5 мл. Использована длительная инкубация (18 часов). Учёт реакции проводился в 96-луночном планшете на ИФА-мультискане с 300 мкл реакционной. Дополнительно использована реакция в иммунологических микропланшетах с соотношением компонентов реакционной смеси 100:2,5:100:100 в том же порядке компонентов реакционной смеси.

### ***Исследуемые группы.***

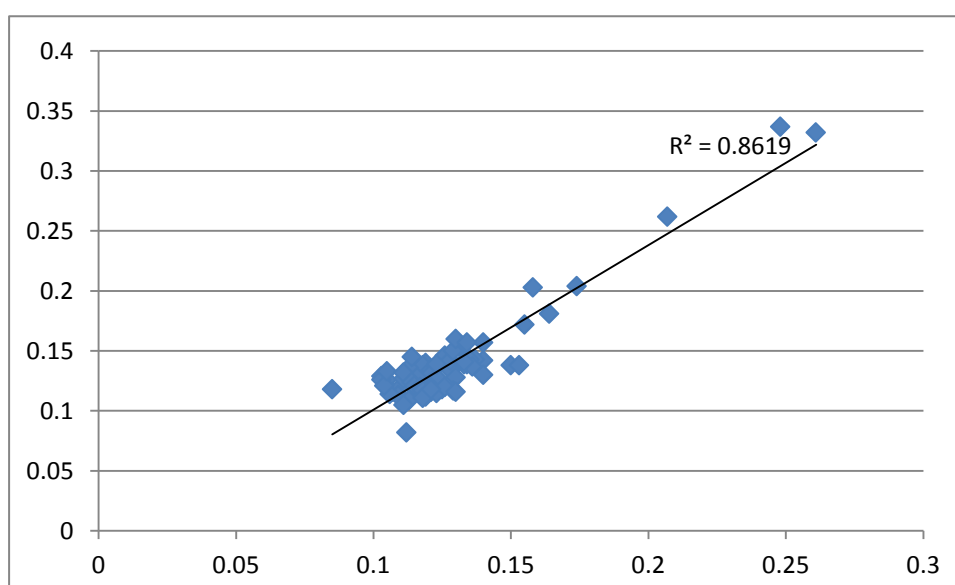
Сравнительная активность для цитидина и гемцитабина была исследована у 80-ти образцов плазмы от пациентов, проходивших обследование на вирусную нагрузку по вирусам гепатитов В и С. Активность цитидиндезаминазы для разных форм вирусной инфекции исследовалась у 27-ми пациентов с выявленной ДНК вируса гепатита В, 96-ти пациентов с вирусным гепатитом С и у 55 пациентов без выявленной вирусной нагрузки по обоим патогенам.

***Статистический анализ*** включал следующие методы:

- 1) метод вариационной статистики с расчетом средних величин (M), стандартных ошибок средних, уровней значимости (p);
- 2) однофакторный корреляционный анализ с расчетом коэффициента регрессии.

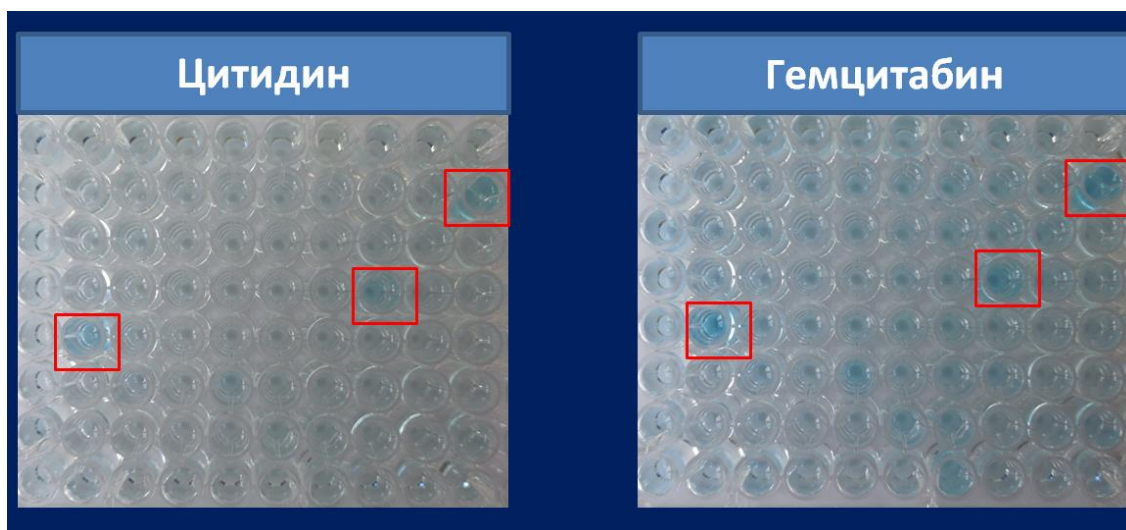
## Результаты и обсуждение

Для 80-ти образцов плазмы произвольно отобранных, среди обследованных на вирусную нагрузку в отношении вирусов гепатитов В и С показатели оптической плотности в индофенольной колориметрической реакции после 18-ти часовой инкубации для цитидина и гемцитабина показали крайне высокую корреляцию, с коэффициентом регрессии  $R=0,93$  (**Рисунок 2**).



**Рисунок 2 – регрессионная связь между значениями оптической плотности в индофенольной колориметрической реакции при использовании цитидина и гемцитабина в качестве субстратов**

Средние активности в отношении цитидина и гемцитабина была сопоставимы:  $4.08 \pm 0.53$  МЕ/л и  $4.27 \pm 0.76$  МЕ/л, соответственно. Причём, следует отметить, что в отношении проб со значениями, превышающими  $+2\sigma$  от среднего, активность по отношению к гемцитабину была выше, чем к цитидину: 15.91 МЕ/л (цитидин) и 21.27 МЕ/л (гемцитабин) и 15.03 МЕ/л (цитидин) и 21.71 МЕ/л (гемцитабин) (**Рисунок 3**). Для образцов в интервале активности от  $+\sigma$  до  $+2\sigma$ , в целом, сохранён тот же тренд.

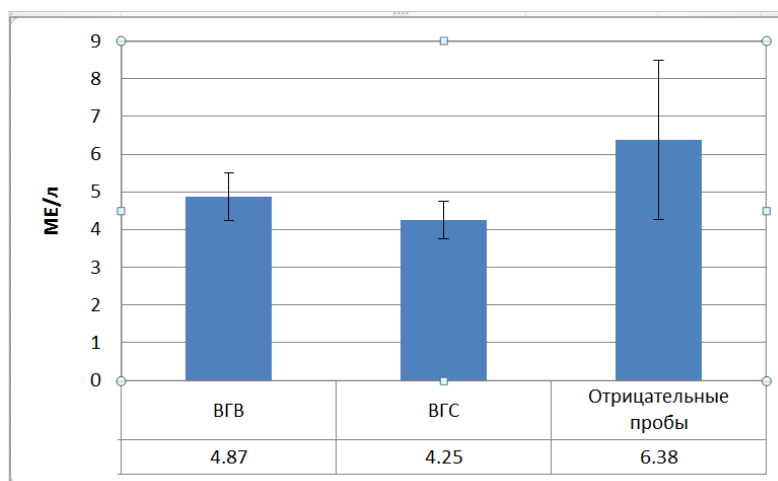


***Рисунок 3 – Сравнение результатов дезаминации для цитидина и гемцитабина***

Следует отметить специфичность данных значений, так как непосредственно уровень свободного аммиака плазмы не превышал 0,1. Для цитидина среднее значение оптической плотности контроля реагентов для пятидесяти проб составило 0,081. Для гемцитабина такое значение было немного выше: 0,09. Соответственно, значения оптической плотности свыше 0,2 не могут быть связаны ни со спонтанной дезаминацией субстрата, ни с остаточным аммиаком плазмы. Постановка реакции в микропланшете позволяет, во всяком случае, выявлять пробы с высоким значением активности цитидиндезаминазы. Так, между высокими значениями активности цитидиндезаминазы в макрореакции (пробирка Эппендорф) и реакцией в микропланшете отмечается корреляционная связь. Для цитидина в микропланшете коэффициент регрессии с цитидином-макро составил  $R=0,71$ . Для гемцитабина, даже выше:  $R=0,71$ . Между двумя микропланшетами также отмечена корреляция:  $R=0,64$ . Таким образом, выявление проб с высоким значением активности цитидиндезаминазы возможно в скрининговой форме с использованием микропланшетов и гемцитабином в качестве субстрата.



Для массива исследованных проб исследованных на вирусную нагрузку было выявлено, что среди проб, в которых были выявлены вирусы гепатита В и С, активность цитидиндезаминазы была ниже, чем среди проб, в которых не было выявлено вирусных частиц (*Рисунок 4*).



**Рисунок 4 – активность цитидиндезаминазы (субстрат-цитидин) среди проб, обследуемых на вирусные гепатиты**

Течение хронического гепатита С сопровождается повышением титров криогаммаглобулинов, тяжёлые цепи которых синтезируются с отличных от нормы по нуклеотидной последовательности V(D)J-рекомбинантов. Вирус активирует молекулу CD81, что приводит к пролиферации В-лимфоцитов и увеличению количества гипермутаций. Это может сопровождаться локальным снижением активности цитидиндезаминазы.

### **Выводы**

1. Активность цитидиндезаминазы в отношении гемцитабина сопоставима с активностью в отношении стандартного субстрата – цитидина.
2. Для проб с высоким значением активности абсолютные значения в отношении гемцитабина даже выше, чем цитидина.

3. Для скрининговых исследований возможно использование микропланшетов.

4. Персистенция вирусов гепатита В и С связано со снижением активности цитидиндезаминазы.

### **Заключение**

Активность цитидиндезаминазы продемонстрировала себя наиболее вариабельным признаком, отражающим индивидуальные особенности ответа на инфекцию и потенциальный биомаркер для поиска пациентов с риском скрытой иммунонедостаточности, не выявляемой при стандартном алгоритме оценки иммунного статуса методами гемограммы и проточной цитометрии. Исследование активности цитидиндезаминазы с использованием гемцитабина позволит глубже и специфичнее изучать данный показатель.

### **Список литературы**

1. Дашкевич, А. М. Безопасность и эффективность вакцины «Флюоваксин» при иммунизации военнослужащих/ А. М. Дашкевич и др.// Здоровоохранение, 2011. –2011. – № 12 – С. 36-40
2. Павлов, К. И. Цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза - ферменты, контролирующие интенсивность и специфичность иммунного ответа: стандартизация активности в норме и диагностическая значимость при заболеваниях/ К. И Павлов. Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, О. А. Янович, С. В. Жаворонок// Медицинский журнал – 2014. – №4
3. Титов Л.П. Иммунология: терминологический словарь. Москва. МИА. 2008. 521 с.
4. Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment/ G. J. Peters, R. J.

Honeywell, M. Maulandi// Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids–2014– № 33 – С. 403-412

5. Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, H.U. (ed.).— Weinheim: Verlag Chemie, 1984. — P. 315–323

**Павлов Кирилл Игоревич,**

*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра  
микробиологии, вирусологии, иммунологии,  
ассистент, магистр мед. наук  
+375 295710911 (МТС)  
E-mail: [zabrrr2008@rambler.ru](mailto:zabrrr2008@rambler.ru)*