

УДК: 575.224.234:574.962

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕМЦИТАБИНА В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

Павлов К.И.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

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 с использованием стандартных объёмов и микроплашетов. 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

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, иммунодефицитная 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. Впоследствии, 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 осуществляющего 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 ингибция 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 внутривиральных комплексов, содержащих клеточную цитидиндезаминазу. Блокировка интравиральными 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 биодegradация крайне схожего по строению атипичного нуклеозида – гемцитабина.

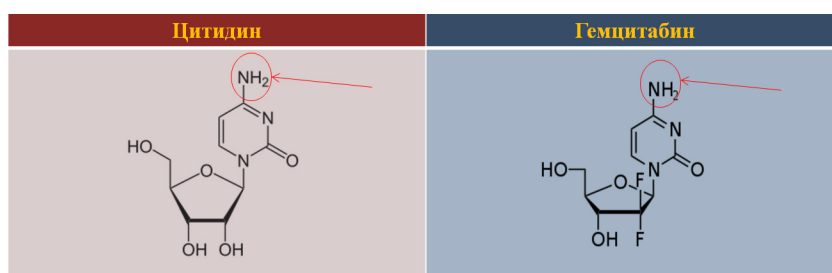


Рисунок 1. – Схожесть строения цитидина и гемцитабина и группа, подтверждающая дезаминацию

Гемцитабин – противоопухолевый препарат, схожий по строению с цитидином и имеющий свободную NH₂-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 с использованием стандартного раствора цитидина [5]. Для сравнения был применен 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 ч). Учёт реакции проводился в 96-луночном планшете на ИФА-мультикане 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 (М), стандартных ошибок средних, уровней значимости (р);
- 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-часовой инкубации для цитидина и гемцитабина показали крайне высокую корреляцию с коэффициентом регрессии $R=0,93$ (рисунок 2).

Средние активности в отношении цитидина и гемцитабина были 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), 21,27 МЕ/л (гемцитабин), 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.

Следует отметить специфичность данных значений, так как непосредственно уровень свободного аммиака плазмы не превышал 0,1. Для цитидина среднее значение оптической плотности контроля

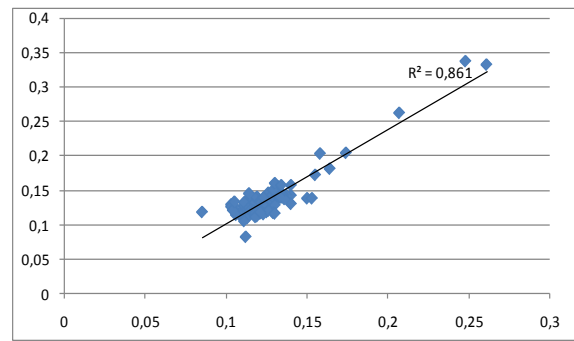


Рисунок 2. – Регрессионная связь между значениями оптической плотности в индофенольной колориметрической реакции при использовании цитидина и гемцитабина в качестве субстратов

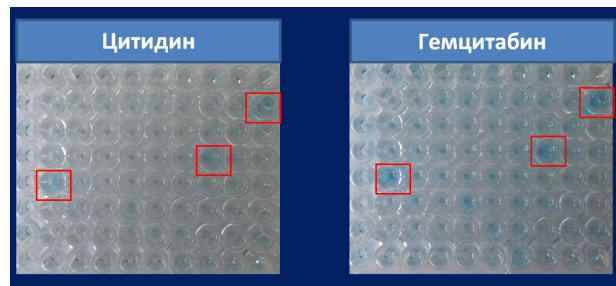


Рисунок 3. – Сопоставление результатов дезаминации для цитидина и гемцитабина

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

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.

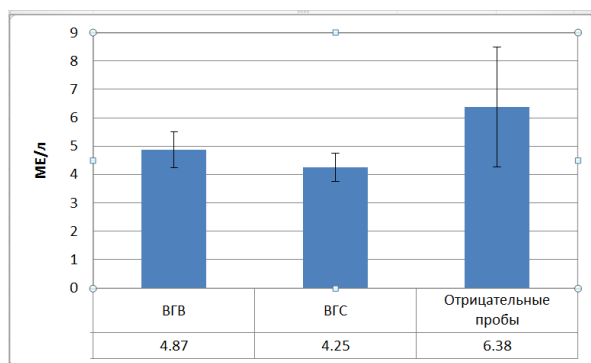


Рисунок 4. – активность цитидиндезаминазы (субстрат-цитидин) среди проб, обследуемых на вирусные гепатиты

Литература

1. Дашкевич, А. М. Безопасность и эффективность вакцины «Флюоваксин» при иммунизации военнослужащих / А. М. Дашкевич и др. // *Здравоохранение*, 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.

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 выступает наиболее вариабельным признаком, отражающим индивидуальные особенности ответа на инфекцию и потенциальным биомаркером 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.

Literatura

1. Dashkevich, A. M. Bezopasnost' i e'ffektivnost' vakciny' «Flyuvaksin» pri immunizacii voennosluzhashhix / A. M. Dashkevich i dr. // *Zdravooxranenie*, 2011. – 2011. – № 12 – С. 36–40.
2. Pavlov, K. I. Citidindezaminaza i adenzindezaminaza – fermenty', kontroliruyushhie intensivnost' i specifichnost' immunnogo otveta: standartizaciya aktivnosti v norme i diagnosticheskaya znachimost' pri zabolevaniyah / K. I. Pavlov, L. P. Titov, A. E. Goncharov, O. A. Yanovich, S. V. Zhavoronok // *Medicinskij zhurnal* – 2014. – №4.
3. Titov L. P. Immunologiya: terminologicheskij slovar'. Moskva. MIA. 2008. 521 s.
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.

CYTIDINE DEAMINASE ACTIVITY MEASUREMENT USING GEMCITABINE AS A SUBSTRATE

Pavlov K.I.

Educational Establishment "Belorussian State Medical University, Minsk, Belarus

Cytidine deaminase enzyme activity is a high individualized indicator for the immune response to infection. The purpose of the research was to evaluate the activity of cytidine deaminase using atypical nucleoside – gemcitabine as a 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 cytidine.

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

Адрес для корреспонденции: e-mail: zabrrr2008@rambler.ru

Поступила 24.05.2015