

*А. Е. Болбас*

## ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ УЧЁТ АКТИВНОСТИ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ИНДОФЕНОЛЬНОЙ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ И РЕАКТИВА НЕССЛЕРА

*Научный руководитель ассист. К. И. Павлов*

*Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск*

**Резюме.** *Статья посвящена комплексному исследованию активности одного из важнейших ферментов иммунной системы организма человека: цитидиндезаминазы. Дается сравнение выявленной активности данного фермента по отношению к различным субстратам, с использованием различных методик, что подводит нас к более полному пониманию всех тонкостей ферментативных механизмов.*

**Ключевые слова:** *соматические гипермутации, иммунофермент, иммуноглобулины, антитела, иммунология, биохимия.*

**Resume.** *The article is devoted to the complex research activity of one of the most important enzymes of the immune system of the human body: cytidine deaminase. Compares the detected activity of the enzyme towards different substrates using a variety of techniques, which brings us to a more complete understanding of all the intricacies of enzymatic mechanisms.*

**Keywords:** *somatic hypermutation, immunoglobulins, enzyme immunoassay, antibodies, immunology, biochemistry.*

**Актуальность.** Цитидиндезаминаза – индуктор соматических гипермутаций генов иммуноглобулинов. Соматические гипермутации – это один из базовых механизмов формирования разнообразия антигенраспознающих структур иммунокомпетентных клеток. Они происходят при интенсивной пролиферации антиген-стимулированных В-лимфоцитов путем точечных мутаций в ДНК, кодирующей переменные регионы генов лёгких и тяжёлых цепей иммуноглобулинов. [4]. В течение последних тридцати лет особенно интенсивно изучаются ферментативные механизмы, обеспечивающие формирование разнообразия и повышения специфичности антител В-лимфоцитов. Ведущую роль в этих процессах играет фермент цитидиндезаминаза, или AID (Activation-induced cytidine deaminase), который выполняет две функции: индукция соматических гипермутаций и переключение синтеза класса иммуноглобулинов. Дефекты в системе соматических гипермутаций могут вызвать снижение гуморального

иммунного ответа, гиперактивность же, напротив, чревата повреждением ДНК и онкогенезом. [1]. Среди методов изучения активности ферментов цитидиндезаминазы значительный удельный вес по-прежнему занимают биохимические колориметрические тесты. Для того, чтобы получить наиболее точную картину ферментативной активности, были предложены методы, повышающие специфичность её исследования.

**Цель:** получить сравнительную характеристику активности фермента цитидиндезаминазы в отношении типичных и атипичных субстратов.

**Задачи:**

1. Повысить специфичность индофенольной колориметрической реакции за счет атипичных субстратов.
2. Подтвердить полученные результаты с помощью реактива Несслера.
3. Адаптировать опыт под планшеты для удобства исследования.

**Материал и методы.**

***Исследованные группы.***

Нормальные показатели цитидиндезаминазы были исследованы в максимально стандартизированной группе из 56 добровольцев без системных и острых заболеваний. Средний возраст исследуемых при возрастном диапазоне от 19 до 59 лет составил  $28 \pm 3$  года. Все 56 добровольцев – лица женского пола.

***Забор образцов материала.***

От каждого исследуемого было получено не менее 6 мл антикоагулированной венозной крови. В течении 3-х часов, избегая охлаждения, кровь доставлялась в лабораторию. Плазма выделялась путём центрифугирования при 1 000 об./мин. в стандартной центрифуге. Депонировалась в пробирки типа эппендорф объёмом 1,5 мл при температуре менее  $-75$  °С в низкотемпературной морозильной камере и исследовалась в течении недели с момента забора.

***Исследование ферментативной активности.***

Активность цитидиндезаминазы исследовалась методом индофенольной колориметрической реакции по методике Giusti и Galanti, а также с помощью реактива Несслера.

Суть индофенольной колориметрической реакции: готовят фенольный реактив (концентрированный раствор фенола, содержащий раствор нитропруссиды натрия и раствор гипохлорита натрия в соотношении 1:1), который смешивают с сывороткой и субстратом. После инкубации с ферментом образующийся в результате дезаминации раствор аммиака взаимодействует с фенолом и гипохлоритом в присутствии нитропруссиды натрия с образованием индофенола интенсивно синего цвета. Колориметрически (с помощью ИФА-мультискана) измеряют оптическую плотность (на длине волны ( $\lambda$ ) 630 нм). [1, 2]

Для проверки индофенольной реакции было предложено провести реакции с реактивом Несслера. Методы схожи. Реактив Несслера (щелочной водный раствор дигидрата тетраиодомеркурата калия) в 5-кратном разведении смешивают с сывороткой и субстратом. После инкубации раствор аммиака взаимодействует с дигидратом тетраиодомеркурата калия в присутствии щелочи с образованием йодида оксодимеркураммония или йодида дийоддимеркураммония красно-коричневого цвета. Колориметрически (с помощью ИФА-мультискана) измеряют оптическую плотность (на длине волны ( $\lambda$ ) 450 нм).

**Таблица 2.** Соотношение реагентов для колориметрических проб

Реагенты	Макропланшет		Плоскодонный		U-образный	
	ИНДФ	НСЛР	ИНДФ	НСЛР	ИНДФ	НСЛР
Субстрат:						
- Цитидин	200 $\mu$ л	200 $\mu$ л	100 $\mu$ л	100 $\mu$ л	40 $\mu$ л	40 $\mu$ л
- Гемцитабин	200 $\mu$ л	200 $\mu$ л	100 $\mu$ л	100 $\mu$ л	40 $\mu$ л	40 $\mu$ л
Сыворотка	5 $\mu$ л	5 $\mu$ л	2,5 $\mu$ л	100 $\mu$ л	4 $\mu$ л	4 $\mu$ л
Фенол-нитропруссид	600 $\mu$ л		100 $\mu$ л	2,5 $\mu$ л	12 $\mu$ л	
Гипохлорит натрия	600 $\mu$ л		100 $\mu$ л		12 $\mu$ л	
Несслер	-	800 $\mu$ л		200 $\mu$ л		200 $\mu$ л

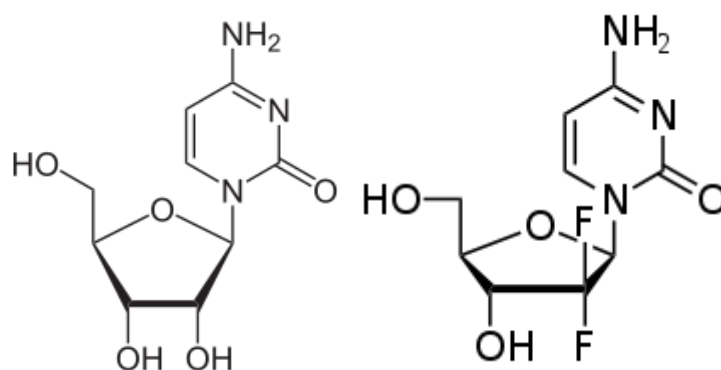
### **Статистическое исследование.**

Обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 6 и Microsoft Excel.

Для определения активности цитидиндезаминазы и повышения специфичности индофенольной колориметрической реакции были использованы два субстрата: типичный субстрат – цитидин, и атипичный субстрат – гемцитабин.

Гемцитабин (дезоксифторцитидин монохлорид) – один из наиболее популярных **современных противоопухолевых** препаратов, вошедших в клиническую практику за последнее десятилетие, в частности, в Республике Беларусь. Гемцитабин представляет собой антиметаболит из группы антагонистов пиримидинов.

Достаточно схожие структурные формулы цитидина и гемцитабина позволили предположить, что сродство гемцитабина к ферменту будет высоким. Это предположение было подтверждено на основе полученных данных.



**Рисунок 5** – Структурные формулы цитидина и гемцитабина

**Результаты и их обсуждение.** Для расчета активности фермента использована специально разработанная формула, учитывающая объем образца, время инкубации, а также оптическую плотность образца и контрольной пробы образца.

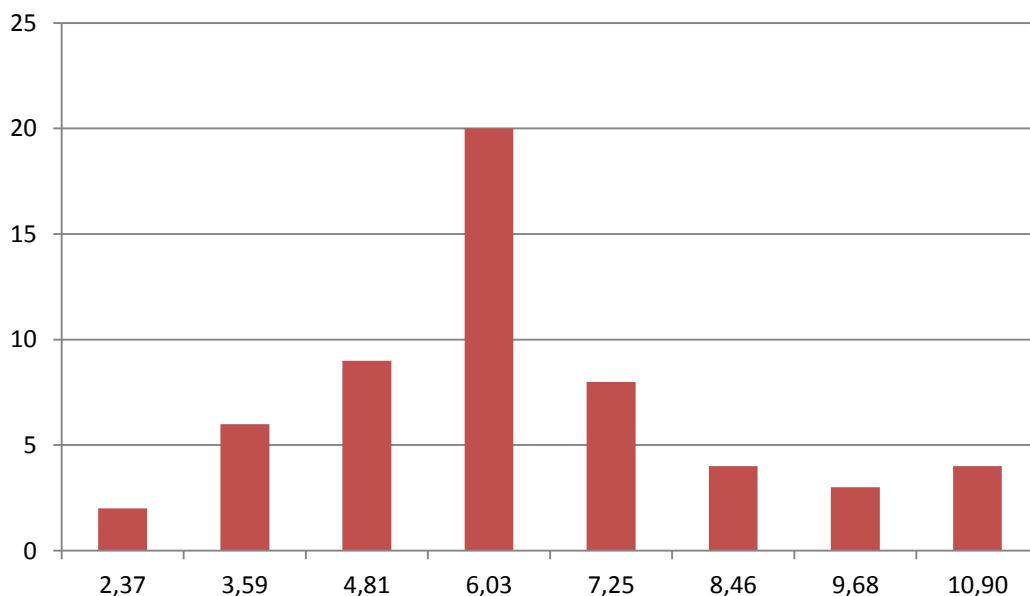
$$\text{Активность (U/l)} = \frac{(A \text{ образца} - A \text{ контроля}) * \text{станд. сульфата аммония (ммоль)}}{(A \text{ образца} - A \text{ контроля}) * t \text{ инкубации} * V \text{ образца (литры)}}$$

**Рисунок 2** – Формула для расчета активности

Международной единицей измерения активности ферментов является МЕ/л (Международная Единица на литр).

Активность цитидиндезаминазы по отношению к цитидину составила 5,75 МЕ/л. Активность же по отношению к гемцитабину составила 4,07 МЕ/л. Исходя из этого, можно сказать, что сродство гемцитабина к ферменту достаточно велико. И это позволяет использовать гемцитабин в качестве субстрата для более специфического учета активности.

Проведя статистические исследования было обнаружено, что распределение активности цитидиндезаминазы среди 56 добровольцев носит нормальный характер. Среднеквадратичное отклонение составило 2,05 ед. В диапазоне одной сигмы – 66,07% всех значений, в диапазоне двух сигм – 92,8%, в диапазоне 3-х сигм – 98,2%.



**Рисунок 3** – Распределение активности фермента

Было установлено, что метод определения активности при участии реактива Несслера работает и коррелирует с индофенольным методом, что позволяет использовать его и дальше без риска получения недостоверных данных. Однако при низких концентрациях реагентов все же предпочтительней использовать индофенольный метод в связи с его более высокой чувствительностью.

Попытка приспособить микропланшеты для данного исследования удалась.

При использовании микропланшетов уровни активность цитидиндезаминазы были сопоставимы с уровнем активности цитидиндезаминазы в макропланшетах, и корреляция между активностью по отношению к разным субстратам или разным методам довольно высока. Это дает возможность использовать их сразу, что облегчит и значительно ускорит работу.

**Выводы:**

1. Реакции с реактивом Нesslerа подтверждают индофенольную реакцию.
2. Используя атипичный субстрат гемцитабин, специфичность индофенольной колориметрической реакции была повышена.
3. Была найдена корреляция между показаниями активности в макропланшетах и U-образных микропланшетах, что говорит о том, что U-образные микропланшеты можно будет использовать для исследований без существенных колебаний в значениях активности, что позволит облегчить и ускорить определение активности иммунофермента.
4. Метод индофенольной реакции и Нesslerа позволили эффективно выявлять индивидов с высоким значением сывороточной цитидиндезаминазы.

*A. E. Bolbas*

**PARALLEL ACCOUNTING CYTIDINE DEAMINASE ACTIVITY BY  
INDOPHENOL COLORIMETRIC REACTION AND NESSLER'S REAGENT**

*Tutor Assistant K. I. Pavlov*

*Department of Microbiology, Virology and Immunology,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

*RSPC Epidemiology and Microbiology, Minsk*

**Литература**

1. Павлов К. И., Титов Л. П., Бутько Л. В. Активность ферментов-индукторов соматических гипермутаций в спленоцитах мышей линии СВ57/BL, амниотической и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. // Сборник научных работ ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, 2013, стр. 328-336.
2. Янович О. О., Титов Л. П., Щерба В. В. Активность аденозиндезаминазы крови при инфекционном мононуклеозе. // Здравоохранение. – 2012. – №: 12. – С. 17-19.
3. Abdulsamie H. et al. Cytidine Deaminase activity in breast cancer. Medical Journal of Babylon. – 2004. – Vol. 1. – P. 32-39.
4. APOBEC3G: an intracellular centurion/ Ya-Lin Chiu, C. G. Warner // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2004. – Vol. 364. – P. 689-700.
5. Zan H. Regulation of Aicda expression and AID activity/ H. Zan, P. Casali// Autoimmunity. – 2013. – Vol. 46. – P. 81-99.