

**А. В. Буцанец**

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА  
ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ**

*Научный руководитель: ассист. К. И. Павлов*

*Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*Резюме. По результатам исследования фермент цитидиндезаминаза проявляет сопоставимую активность по отношению к цитидину и атипичному нуклеозиду гемцитабину, использование гемцитабина для изучения активности фермента целесообразно.*

*Ключевые слова: цитидиндезаминаза, цитидин, гемцитабин.*

**A.V. Butsanets**

**STANDARDIZATION OF THE CYTIDIN DEAMINASE ACTIVITY RESEARCH**

*Tutor: assistant K. I. Pavlov*

*Department of Microbiology, Virology, Immunology,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

*Resume. According to the results of the research, cytidine deaminase shows identical activity in the reaction with cytidine and with gemcitabine. Gemcitabine can be used for cytidin deaminase activity research.*

*Key words: cytidine deaminase, cytidine, gemcitabine.*

**Актуальность.** Цитидиндезаминаза (ЦДА) является индуктором соматических гипермутаций генов иммуноглобулинов. Соматические гипермутации – это один из базовых механизмов формирования разнообразия антигенраспознающих структур иммунокомпетентных клеток. Фермент обладает прямой антиретровирусной активностью при условии высокого внутриклеточного содержания рибонуклеопротеидов и свободной РНКазы, участвует в процессах репарации ДНК и биодеградации свободных нуклеотидов, задействован в метаболизме аминокислот. Недостаточность системы, индуцирующей соматические гипермутации, приводит к иммунодефицитам различной степени выраженности. Среди методов изучения активности фермента цитидиндезаминазы значительный удельный вес по-прежнему занимают биохимические спектрофотометрические и колориметрические тесты. Индофенольная колориметрическая реакция, где в качестве субстрата используются растворы нуклеозидов, экономически выгодна и достаточно наглядно отражает уровень активности ЦДА в сыворотке крови. Потому стандартизация и повышение точности данного метода исследования может быть полезна для внедрения его в клиническую практику.

**Цель:** сравнение активности фермента цитидиндезаминазы по отношению к цитидину и гемцитабину.

**Материалы и методы.** Растворы цитидина и гемцитабина в concentra-

ции 21 мМоль/л, фенольно-нитропруссидный раствор – 106 мМоль/л, растворы нитропруссиды натрия – 50 мг/л и 200 мг/л, раствор гипохлорита натрия в концентрации 11 ммоль/л. Сыворотки крови от 10 здоровых добровольцев. Активность цитидиндезаминазы измерялась в индофенольной колориметрической реакции по методике Giusti со следующим соотношением реакционных компонентов: 200 мкл субстратного раствора : 20 мкл исследуемой сыворотки : 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора : 600 мкл основного раствора гипохлорита натрия. Инкубация проводилась при 37°C в пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл в течение 22 часов. Для учета результатов использован 96-луночный планшет, иммуноферментный анализатор-мультикан. Обработка полученных данных произведена с помощью программы Microsoft Excel 2010.

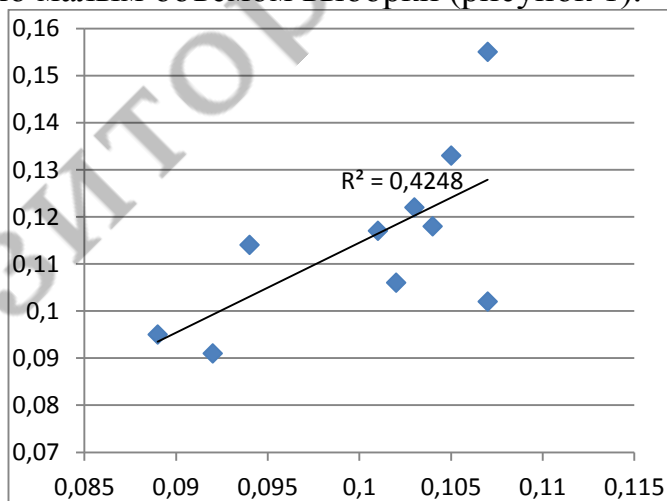
**Результаты работы.** Цитидиндезаминаза активна в отношении большого количества минорных нуклеозидов и нуклеозидоподобных соединений, что позволяет использовать раствор гемцитабина в качестве субстратного раствора при проведении индофенольной колориметрической реакции.

Основная проблема в исследованиях активности цитидиндезаминазы в плазме связана со стандартизацией нормальных показателей ферментативной активности. Есть две тенденции в интерпретации сывороточной активности цитидиндезаминазы: первая постулирует активность данного фермента как переменный признак, характеризующийся высокой степенью спонтанных колебаний; вторая тенденция связана с тем, что активность цитидиндезаминазы в плазме характеризуется крайне низким уровнем и любое значительное повышение имеет высокую диагностическую значимость. Выделение из общей группы добровольцев только здоровых лиц от восемнадцати до двадцати пяти лет делалось с целью установить оптимальный уровень активности ЦДА. По результатам исследования значения активности ЦДА в отношении цитидина и гемцитабина сопоставимы (таблица 1).

Номер образца	Показатели оптической плотности после реакции с цитидином	Активность в реакции с раствором цитидина, МЕ/л	Показатели оптической плотности после реакции с гемцитабином	Активность в реакции с раствором гемцитабина, МЕ/л
1	0,094	0,34	0,144	0,63
2	0,103	0,58	0,122	0,84
3	0,101	0,53	0,117	0,71
4	0,107	0,69	0,155	1,72
5	0,105	0,63	0,133	1,14
6	0,089	0,21	0,095	0,13
7	0,104	0,61	0,118	0,74
8	0,102	0,55	0,106	0,42
9	0,107	0,69	0,102	0,32
10	0,092	0,53	0,091	0,73
<b>Среднее значение, (M±m)</b>	<b>0,10±0,02</b>	<b>0,54±0,05</b>	<b>0,12±0,01</b>	<b>0,74±0,14</b>

**Таблица 1.** Оптическая плотность растворов после инкубации и активность ЦДА в реакциях дезаминирования цитидина и гемцитабина

Показатели оптической плотности в индофенольной колориметрической реакции после 22-ти часовой инкубации для цитидина и гемцитабина показали слабую положительную корреляцию с коэффициентом регрессии  $R=0,64$ , что может быть объяснено малым объемом выборки (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Связь между значениями оптической плотности в индофенольной колориметрической реакции при использовании цитидина и гемцитабина в качестве субстратов

**Заключение.** В исследовании установлено, что использование атипичного нуклеозида – гемцитабина – целесообразно для определения активности цитидиндезаминазы.

**Информация о внедрении результатов исследования.** По результатам данного исследования опубликован один тезис доклада. Получен диплом 3-й степени XXIII Республиканского конкурса научных работ студентов

### Литература

1. B-cell receptor cross-linking delays activation-induced cytidine deaminase induction and inhibits class-switch recombination to IgE / Н. Jabara et al. // *J Allergy Clin Immunol* – 2008 – Vol.121. – P. 191-19
2. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection / В. Chackerian et al. // *J. Virol.* – 1997 – Vol. 71. – P. 3932–3939
3. Титов, Л. П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология. / Л. П. Титов, И. А. Карпов // *Медицинский журнал.* – 2007. – №1. – С. 4-14.
4. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus / J. Wrasmert et al. // *Nature.* – 2008 – Vol. 453. – P. 667-671
5. The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA [Электронный ресурс] – BRENDA, 2014. – Режим доступа: <http://www.brenda-enzymes.org/> (Дата обращения: 01.03.2016).