

*Е. Ю. Карнеевич, И. Р. Соболевская*  
**ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА  
«РИБАВИРИН» НА АКТИВНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТОВ  
АДЕНОЗИДЕЗАМИНАЗЫ И ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ**

*Научный руководитель: канд. мед. наук К. И. Павлов  
Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии  
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*E. J. Karneevich, I. R. Sobolevskaya*  
**EFFECT OF ANTIVIRAL DRUG «RIBARINE» ON THE ACTIVITY OF IMMUNOENZYMES ADENOSINDESAMINASE AND CYTIDINEDESAMINASE**

*Tutor: associate professor C. I. Pavlov  
Department of microbiology, virusology and immunology  
Belarusian state medical university, Minsk*

**Резюме:** Проведено исследование активности цитидиндезаминазы и аденозиндезаминазы в эксперименте у крыс линии Wistar, получавших лекарственное средство «Рибавирин» перорально в течение трёх суток в дозе 1000 мг/кг. На основании проведенной работы можно сделать общий вывод, о безопасности лекарственного средства «Рибавирин» при кратковременном пероральном применении относительно уровня активности ферментов-нуклеозидаз ЦДА и АДА в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** цитидиндезаминаза, аденозиндезаминаза, «Рибавирин», биохимические показатели, ферменты-нуклеозидазы.

**Resume:** The activity of cytidinesaminase and adenosinedeaminase was studied in the experiment in Wistar rats receiving the drug “Ribavirin” orally for three days at a dose of 1000 mg/kg. On the basis of this work, we can make a General conclusion about the safety of the drug “Ribavirine” with short-term oral administration for the level of enzyme activity-nucleosidase CDA and ADA in the blood serum.

**Key words:** cytidinesaminase, adenosinedeaminase, “Ribavirin”, biochemical parameters, enzymes-nucleotidase.

**Актуальность.** В ходе многочисленных научных исследований было выявлено, что ферменты-нуклеозидазы цитидиндезаминаза (ЦДА) и аденозиндезаминаза (АДА) являются одними из наиболее важных регуляторов всех этапов иммунного ответа. Изменение активности данных иммуноферментов при таких заболеваниях, как инфекционный мононуклеоз, ВИЧ-инфекция и вирусный гепатит С придает им важное диагностическое значение, так как для лечения данных заболеваний необходим подбор лекарственных средств, имеющих, по преимуществу, нуклеозидное строение. К числу таких лекарственных средств относится рибавирин – противовирусное лекарственное средство на основе цитидина. Влияние иммуноферментов ЦДА и АДА на метаболизм рибавирина не изучено. Отсутствуют сведения о уровнях ЦДА и АДА сыворотки крови при использовании данного лекарственного средства.

Цитидиндезаминаза человека — это димер, который построен из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 28 кДа. Функции: редактирование АРОВ-иРНК, репарация ДНК, поддержание стабильности генома, дезаминирование цитидина свободных нуклеозидов и нуклеиновых кислот [1]. Аденозиндезаминаза – фермент, отвечающий за трансформацию аденозина свободных нуклеозидов и нуклеиновых кислот в инозин с отщеплением аммиака. АДА является одним из компонентов аденилатного метаболического пути, регулируя таким образом баланс всех свободных нуклеозидов внутриклеточно и в плазме, а также определяет структуру рецептора интерлейкина-2 (сильный противовоспалительный цитокин) [2].

Рибавирин - синтетический аналог нуклеозидов с выраженным противовирусным действием. Рибавирин эффективен в отношении многих ДНК и РНК вирусов, не чувствительных к другим противовирусным препаратам. Рибавирин легко проникает в поражённые вирусом клетки и быстро фосфорилируется внутриклеточной аденозинкиназой и образующийся рибавирин трифосфат конкурентно подавляет образование гуанозин трифосфата, тем самым снижая синтез вирусных РНК. Рибавирин селективно ингибирует синтез вирусной РНК, не подавляя синтез РНК в нормально функционирующих клетках [3].

**Цель:** изучить активность ЦДА и АДА в эксперименте у крыс линии Wistar, получавших лекарственное средство «Рибавирин» перорально в течение трёх суток в дозе 1000 мг/кг.

**Задачи:**

1. Определить активность ЦДА и АДА при помощи индофенольной колориметрической реакции.
2. Сравнить показатели активности ЦДА у крыс.
3. Сравнить биохимические показатели.
4. Сравнить АДА и ЦДА крыс и мышей.

**Материалы и методы.** В ходе выполнения данной работы исследовалась группа, состоящая из 6 крыс самцов, получавших рибавирин в дозе 1000 мг/кг. Для сравнения использованы интактные животные, количеством 25. Активность аденозин- и цитидиндезаминазы исследовалась методом индофенольной колориметрической реакции. Цитидин с исследуемой сывороткой инкубировался в течении 22-х часов, аденозин – как стандартно, в течении 1-го часа, так и длительно – 22 часа. Данные исследовались методами описательной статистики. У животных выполнялось исследование гематологических и биохимических показателей крови. Статистическая обработка результатов измерения активности ЦДА и АДА выполнена с использованием статистического модуля программы Microsoft Excel 2010, а также пакета статистического анализа данных «STATISTICA 6» (StatSoft, США).

**Результаты и их обсуждение.** Методика определения активности ЦДА и АДА при помощи индофенольной колориметрической реакции: аммиак в присутствии гипохлорита натрия и фенола в щелочном растворе при катализе нитропруссидом натрия образует индофенол, имеющий интенсивно синюю окраску.

$$\text{Активность (МЕ/л)} = \frac{(\text{ОП образца} - \text{ОП контроля образца}) \times \text{стандарт сульфата аммония (ммоль)}}{(\text{ОП стандарта} - \text{ОП контроля реагентов}) \times \text{время инкубации (мин.)} \times \text{объём образца (литры)}}$$

**Рис.1** – Формула для расчета активности фермента

**Табл. 1.** Схема постановки индофенольной колориметрической реакции

Реагенты	Контроль реагентов	Стандартный раствор	Контроль образца	Опытная проба
Фосфатный буфер	200 мкл	-	-	-
Буферный раствор цитидина	-	-	200 мкл	200 мкл

Реагенты	Контроль реагентов	Стандартный раствор	Контроль образца	Опытная проба
Стандартный раствор сульфата аммония	-	200 мкл	-	-
Образец	-	-	-	20 мкл
Дистиллированная вода	20 мкл	-	-	-
Перемешивали и инкубировали при 37 °С 22 часа для ЦДА и 1 час для АДА				
Фенольно-нитропруссидный раствор	600 мкл	600 мкл	600 мкл	600 мкл
Образец	-	-	20 мкл	-
Щелочной раствор гипохлорита натрия	600 мкл	600 мкл	600 мкл	600 мкл
Перемешивали и инкубировали 40 минут при 37 °С после чего измеряли оптическую плотность растворов на ИФА-анализаторе				

Активность ЦДА (МЕ/л) в контрольной группе составляет 1,3 0,6, во 2 группе 1,8 0,46 (Рис. 2).

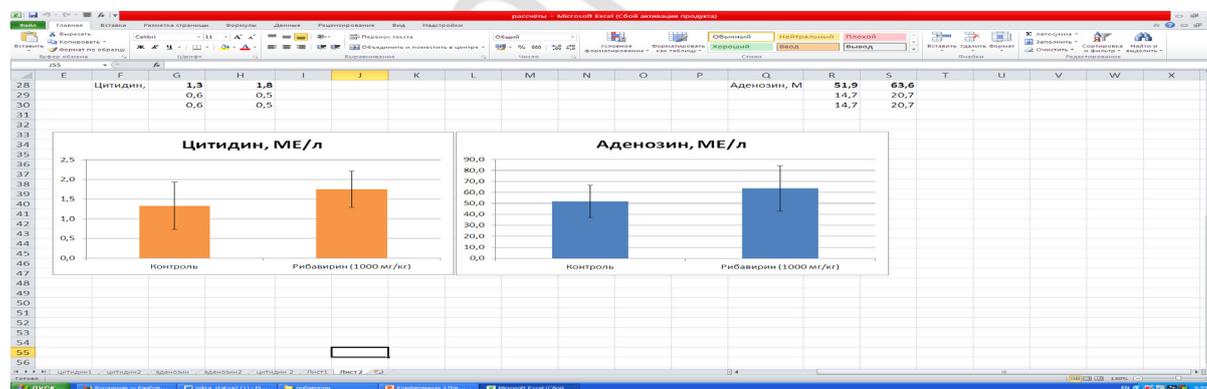


Рис. 2 - Исследование активности ЦДА и АДА у крыс, получавших лекарственное средство «Рибавирин»

Активность АДА сыворотки крови крыс контрольной группы характеризовалась крайне высоким значением. Так, Активность АДА (МЕ/л) в контрольной группе составляет  $51,9 \pm 14,7$ , в 2 группе  $63,6 \pm 20,7$  (Рис. 2).

Исследование активности ЦДА и АДА выполнялось одновременно с исследованием ряда биохимических показателей: общий белок, мочеви́на, креатинин, AST, ALT. Данные биохимические показатели в контрольной группе и группе, получавшей лекарственное средство «Рибавирин» 1000 мг в течении 3 дней, отличается незначительно и не выходят за рамки возраста и сезона (Рис. 3).

Табл. 2. Биохимические показатели контрольной группы и группы крыс, получавших лекарственное средство «Рибавирин»

Полученная доза	Показатель						
	Цитидин, МЕ/л	Аденозин, МЕ/л	Общий белок, г/л	AST, МЕ/л	ALT, МЕ/л	Креатинин, мкмоль	Мочевина, ммоль/л
Контроль	1,3±0,60	51,9±14,69	62,3±2,80	1,4±0,59	25,6 ±7,43	49,5±1,64	5,9±1,54
Рибавирин, 1000 мг/кг	1,8±0,46	63,6±20,66	67,3±5,61	1,1±1,20	24,3 ±18,22	47,3±10,23	5,7±1,61

Биохимические показатели не характеризовались выраженными отличиями как между опытной и контрольной группами, так и по выраженности индивидуальных колебаний. При этом, уровень активности АДА превышает уровень активности ЦДА в 40 раз. Вариация в субстратной активности в отношении аденозина была немного меньше: в 2,37 раза. В среднем, активность АДА была в 40 раз выше, чем ЦДА у той же особи.

Несмотря на то, что исследовались линейные животные, схожие по массе и возрасту, полученные в результате близкородственного скрещивания и содержавшиеся на протяжении всей жизни в одинаковых условиях, индивидуальная амплитуда колебаний активности ЦДА была очень высокой: от минимальной 0,8 МЕ/л до максимальной 2,4 МЕ/л, то есть в 3 раза. (критерий Колмогорова-Смирнова,  $p > 0,20$ ). Значения АДА характеризовались меньшей вариабельностью. Абсолютное значение АДА было отмечено, как высокое. Диапазон колебаний активности АДА в контроле, варьировал от минимального значения 29 МЕ/л до максимального в 68,7 МЕ/л, а в 1000 мг от 42,1 до 93,3 (критерий Колмогорова-Смирнова,  $p > 0,20$ ).

#### **Выводы:**

1. Средняя активность ЦДА сыворотки крови крыс самцов в контрольной группе характеризовалось низким значением, не превышавшем 3 МЕ/л при крайне высокой индивидуальной вариативности признака.

2. Высокая индивидуальная вариабельность активности ЦДА у здоровых животных, сходных по полу, массе, возрасту, уровню питания может указывать на роль фермента ЦДА, как индивидуализированного (персонализированного) маркёра (сенсора) состояния иммунной системы.

3. Активность АДА сыворотки крови крыс контрольной группы характеризовалась крайне высоким значением (выше 50 МЕ/л).

4. Пероральное использование нуклеозидоподобного лекарственного средства «Рибавирин» в течение 3-х суток в дозе 1000 мг/кг не оказало значительного эффекта на уровень ЦДА и АДА, а также не приводило к изменениям таких биохимических показателей крови, как общий белок, мочевина, креатинин, AST, ALT.

5. Лекарственное средство «Рибавирин» безопасно при кратковременном пероральном применении для уровня активности ферментов-нуклеозидаз ЦДА и АДА в сыворотке крови.

#### **Литература**

1. Kellems R.E., Yeung C.Y., Ingolia D.E. Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies / R.E. Kellems, C.Y. Yeung, D.E. Ingolia // Trends Genet. – 1985. – Vol. 1. – P. 278-283.
2. Specchia G., Pavon V., Maggio F. Bull.Inst.Sieroter. / G. Specchia, V.Pavon, F. Maggio // – 1985.

– P.404-407.

3. Sufrin G., Tritsch G., Mittelman A. Cancer 1977. / G. Sufrin, G.Tritsch, A. Mittelman // – Vol.40. – P.796-802.

4. Moyer J., Henderson J. Critical Rev.Biochem. / J. Moyer, J. Henderson // -1985. – Vol.19. – P. 45-61.

5. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс] / Лекарства и субстанции. – Режим доступа: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_288.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_288.htm).

Репозиторий БГМУ