К. И. Павлов, Л. П. Титов, А. Е. Гончаров,
О. А. Янович, С. В. Жаворонок

ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗА И АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА – ФЕРМЕНТЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ИНТЕНСИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУННОГО ОТВЕТА: СТАНДАРТИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ В НОРМЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Цель исследования – оценить диагностическую значимость колебаний активности цитидиндезаминазы и аденозиндезаминазы в норме при максимально строгом формировании выборки в сравнении с острой (инфекционный мононуклеоз) и хронической (гепатит С) вирусной инфекцией. В двух группах исследуемых, собранных по широкому (n = 10,) и узкому (n = 19) принципу формирования выборки и у пациентов с хроничееским вирусным гепатитом С (n = 29) и инфекционным мононуклеозом (n = 8) оценивалась активность иммуноферментов, измерялось содержание CD19 + и CD8 + клеток исследовался клональный статус В-лимфоцитов. Была оценена активность цитидиндезаминазы, у пациентов с пневмониями, развившимися в эпидсезон гриппа 2012–13. Активность цитидиндезаминазы при пневмонии (8,14 МЕ), как и при инфекционном мононуклеозе (4,37 МЕ) оказалась достоверно высокой. Пациенты с диагнозом хронического гепатита С имели умеренные уровни активности цитидиндезаминазы (1,21 МЕ). Клональный статус при этом, значительно не измеялся. Активность иммуноферментов оказывается наиболее вариабельным индивидуализированным признаком, отражающим особенности ответа на инфекцию.

Ключевые слова: *цитидиндезаминаза, соматические гипермутации, реанжировки генов иммуноглобулинов, хронический вирусный гепатит С, инфекционный мононуклеоз.*

K. I. Pavlov, L. P. Titov, A. E. Honcharou,
O. A. Yanovitch, S. V. Javoronok

CYTIDINE DEAMINASE AND ADENOSINE DESAMINASE – IMMUNE RESPONSE INTENSITY END SPECIFY ENZYMATIC REGULATORS: BASAL ACTIVITY LEVELS STANDARDIZATION AND ESTIMATION OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

The purpose of the study was to evaluate the diagnostic of adenosine deaminase and cytidine deaminase basal serum activity at the maximum standardized cohort formation. Immunoenzimes activity and clonal status in groups of infectious mononucleosis (n = 8), chronic hepatitis C infection (n = 29), and pneumonia developing into 2012–13 influenza epidemic season was measured comparably to two groups formed on a wide (n = 10) and narrow (n = 19) principle of sampling. The content of CD19 + and CD8 + cells was measured by flow cytometry. B-cells clonal status was estimated by immunoglobulin heavy chains rearrgement PCR analysis. Cytidine deaminase activity in pneumonia (8.14 U), as well as in infectious mononucleosis (4.37 U) was found to be high in comparison with the control group (1.1 U for wide cohort and 2.29 U – for the optimum-group.) In contrast, patients with a diagnosis of chronic hepatitis C had low levels of cytidine deaminase activity (1.21 U). Polyclonal pattern prevailed in clonal status for optimum group, patients with mononucleosis and chronic hepatitis C infection. Immunoenzimes activity manifested as the most variable individualized feature, reflecting particular response to infection.

Key words: *Cytidine deaminase, somatic hypermutations, immunoglobulin genes rearrgements, chronic HCV infection, infectious mononucleosis.*

Репозиторий БГМУ

В процессе реализации протективного ответа на чужеродный антиген иммунная система использует ряд многофункциональных ферментов-регуляторов, активных на всех стадиях формирования клеточных и гуморальных механизмов защиты [1]. К таким ферментам относятся факторы биодеградации свободных нуклеозидов – аденозиндезаминаза и, особенно, фермент-индуктор соматических гипермутаций генов иммуноглобулинов – цитидиндезаминаза. За счёт многообразия точек воздействия таких иммуноферментов осуществляется сложная регуляция процессов селекции иммунокомпетентных клеток, их поликлональной и клональной активации, созревания аффинности вырабатываемых антител [2]. В свою очередь, вторгаясь в эти механизмы ряд микробных и вирусных агентов способны реализовывать свой патогенный потенциал и жизненный цикл [3, 4]. Подобные опции описаны у вирусов гриппа, гепатита С, вируса Эпштейна-Барр, бактерии Helicobacter pylori [5, 6]. 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 [5]. 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 [6]. Онкогенность Helicobacter pylori может быть связана с нарушением цитидиндезаминаза-зависимых репарации ДНК и реметилирования из-за хронического воспаления гастрального эпителия [5].

Если параметры активности аденозиндезаминазы и диагностическая роль данного исследования прописана относительно хорошо, то значения активности цитидиндезаминазы и перечень патологических состояний, где бы данное исследование имело диагностическую значимость пока не стандартизирован, хотя ряд исследователей проводил широкую экспериментальную работу в этом направлении. Первоначально, исследование сывороточной цитидиндезаминазы было предложено для ранней диагностики гестозов [7]. P. W Thompson et al. отмечал, что ревматоидный артрит сопровождается значительным повышением уровня сывороточной цитидиндезаминазы (17 МЕ и выше), пропорциональным активности воспалительного процесса [8]. Согласно Abdulsamie H, повышение активности цитидиндезаминазы свыше 14 МЕ может быть эффективным маркером рака груди [9].

Цель исследования – оценить диагностическую значимость колебаний активности иммуноферментов цитидиндезаминазы и аденозиндезаминазы в норме при максимально стандартизированном формировании выборки. Оценить состояние активности иммуноферментов при острой (инфекционный мононуклеоз) и хронической вирусной инфекции (гепатите С).

Материалы и методы

Исследуемые группы. Для исследования были отобраны следующие когорты: 1) Группа сравнения: здоровые добровольцы мужского и женского пола, возраст – 24–31 года, n = 10. 2) Оптимизационная выборка: здоровые добровольцы только мужского пола, в узком возрастном диапазоне – 18–25 лет, n = 19. 3) Пациенты с диагнозом хронического гепатита мужского и женского пола в широком возрастном диапазоне от 27 до 70 лет, n = 29. 4) Пациенты с диагнозом инфекционного мононуклеоза, возраст – 24–34 года, n = 10. 5) Пациенты с диагнозом пневмония, возраст – 6–16 лет, n = 10.

Проточная цитометрия. Контроль получаемой для исследования клонального статуса клеточной суспензии производился на проточном цитофлуориметретре FACSCalibur (Becton Dickinson): оценивалось наличие популяции лимфо- и моноцитов на цитограммах прямого и бокового светорассеяния, отсутствие других клеточных фракций, а также жизнеспособность клеток по инкорпорации витального красителя пропидия йодида (1 мкг/мл). Для 10-ти образцов оптимизационной группы (М, 18–25 лет) и 10-ти образцов группы сравнения оценивалась экспрессия поверхностных молекул CD19 и CD8 с использованием моноклональных антител anti-human CD19 FITC и anti-human CD8 PC5.

Определение клонального статуса популяции В-лимфоцитов. Для исследования брались образцы антикоагулированной венозной крови объёмом 4 мл. Мононуклеарные лейкоциты выделялись путём центрифугирования на градиенте Ficol-Paque, и концентрировались в количестве не менее 50 млн клеток в 100 мкл буферного

Репозиторий БГМУ

раствора. Экстракция ДНК проводилась набором «Нуклеосорб-В» (РФ) в соответствии с инструкцией изготовителя. Качество и количество полученной ДНК определялось методом агарозного гель-фореза. Определение клональных реанжировок В-лимфоцитов проводилось с использованием праймеров набора ISH Somatic Hypermutation Assay (InVivoscribeTechnologies, USA) после тестирования качества ДНК праймерами Specimen Control Size Ladder (InVivoscribeTechnologies, 2-096-0020). ПЦР реакция проводилась по стандартной схеме с использованием не менее 1,25 U SynTaq полимеразы («Синтол», РФ), 7 мкл исследуемого образца ДНК и длительностью в 34 цикла. Детекция результатов производилась путём гель-фореза в 1% и «вязкой» 3% агарозе с этидием бромидом и учётом на трансиллюминаторе. В качестве стандартного клонального контроля использована ДНК линии IVS-0013 Clonal Control, (InvivoscribeTechnologies). В качестве поликлонального контроля была использована ДНК линии IVS-0000 Polyclonal Control, (InvivoscribeTechnologies) [10, 11]. Съёмка фореграмм проводилась на цифровую фотокамеру с разрешением 14 мегапикселей, сохранением в формате. jpg и последующим анализом пакетом программ GenAnalyzer.

Учёт ферментативной активности. Активность аденозин- и цитидиндезаминазы измерялась в индофенольной колориметрической реакции по методике Giutsi, со следующим соотношением реакционных компонентов: 200 мкл субстратного раствора: 20 мкл исследуемой сыворотки: 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора: 600 мкл основного раствора гиппохлорита [1]. Реакция проходила при 37 °С в пробирке типа Эппендорф, обьёмом 1,5 мл. Учёт реакции проводился в 96-луночном планшете на ИФА-мультискане с 300 мкл реакционной смеси [1]. Цитидин с исследуемой сывороткой инкубировался в течении 22-х часов, аденозин – как стандартно, в течении 1-го часа, так и длительно – 22 часа [1, 2, 9].

Статистическое исследование. Обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 6 for Windows и Microsoft Exel. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Средняя и оптимальная активности аденозиндезаминазы и цитидиндезаминазы в норме. Определение значения нормы проводилась на двух группах с разными принципами формирования выборки – широкий охват и определение оптимума. Группа широкого охвата состояла из десяти здоровых добровольцев мужского и женского пола, возрастом 24–31 года. Оптимум-группа была представлена девятнадцатью добровольцами только мужского пола в более узком возрастном диапазоне – 18–25 лет. Для значения активности цитидиндезаминазы формирование выборки по оптимизационному принципу позволило уменьшить относительное значение ошибки репрезентативности. То есть в группе сравнения с широким формированием выборки доверительный интервал составил 36% от среднего значения, а в группе относительно здоровых мужчин 18–25 лет он составил 22% от среднего значения. Тем не менее, даже при подобном формировании когорты диапазон колебаний цитидиндезаминазы в данной группе варьировал от минимального значения 0,58 МЕ до максимального в 4,91 МЕ. В отличии от аденозиндезаминазы, активность в отношении цитидина при короткосрочной инкубации (1 час) не определялась, что указывает на низкую кинетику ферментативной активности в сыворотке, низком «обороте» фермента.

Таблица 1. **Активность иммуноферментов в норме при широком и оптимизационном принципе формирования выборки * – статистически значимый уровень различий p = 0,05 с группой сравнения)**

	Аденозиндезаминаза, МЕ	Цитидиндезаминаза, МЕ
Группа сравнения	12.08 ± 5.24	1.10 ± 0.40
Оптимум-группа	11.10 ± 2.20*	2.29 ± 0.50*

Характеристика клональности популяции В-лимфоцитов и активность иммуноферментов. Топографию образующихся в результате реанжировок генов иммуноглобулинов определяют с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, комплементарных к константным фрагментам вариабельного домена тяжёлой цепи (в данном случае – FR1) [8, 9]. Тогда образуемый ампликон будет отражать весь вариабельный домен с FR1 и до окончания J-региона Интерпретация клонального статуса В-лимфоцитов основана на оценке диапазона образуемых ампликонов (рисунок 1). Исходя из того, что средняя длина V гена составляет около 300 нуклеотидных пар, J гена – 46–63, а D-гена – 17–37 нуклеотидных пар, длина конечного продукта реанжировок будет колебаться от 360 до 400 нуклеотидных пар [10, 11, 12, 13]. Аналитическую значимость в данных исследованиях, в отличии от стандартной диагностической ПЦР представляет не только учёт наиболее ярких полос, но вся длина шмера, так как продукты реанжировок в силу изначального отличия по длине реанжируемых фрагментов, сплайсинга и деле-

Репозиторий БГМУ

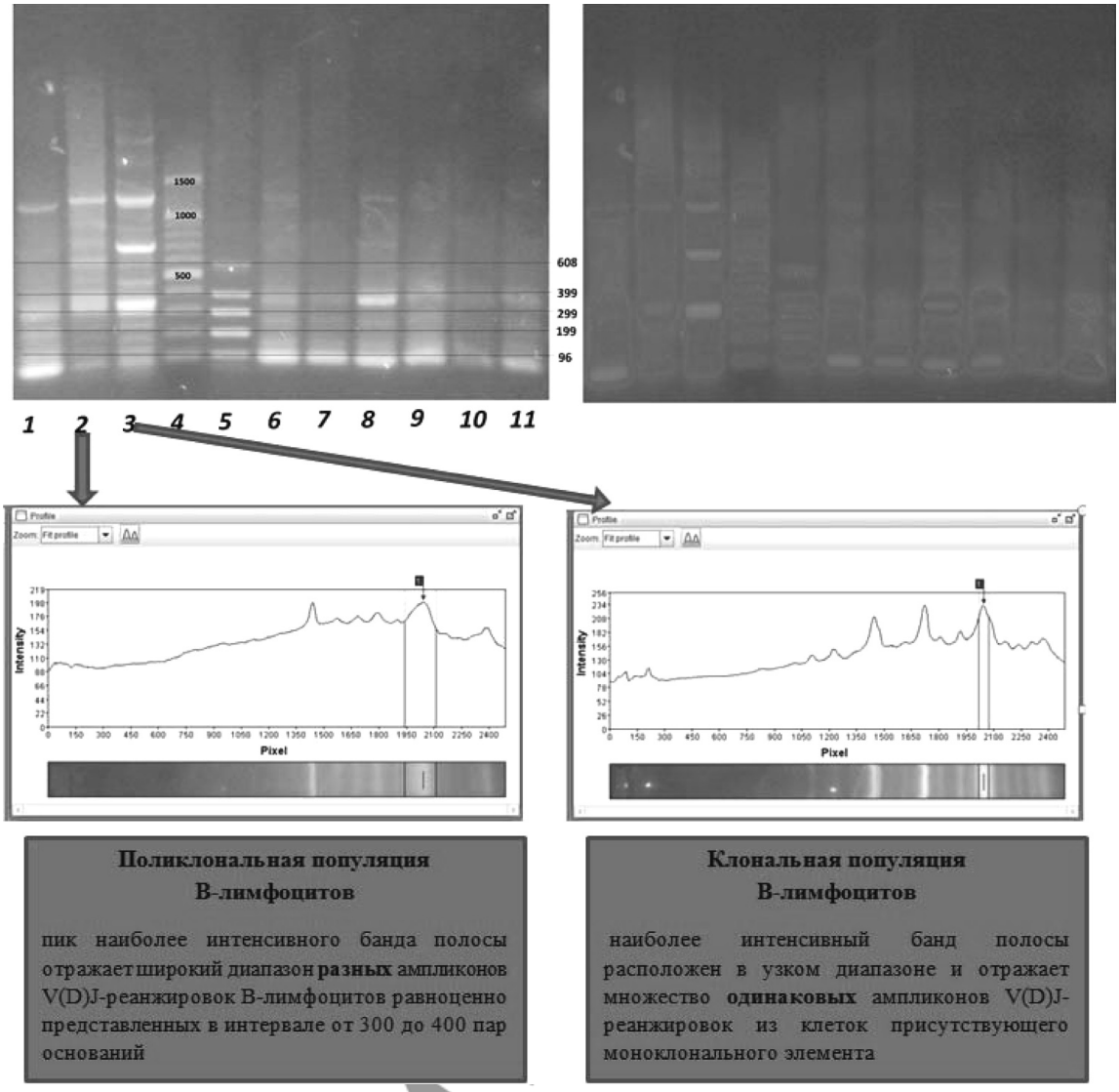

Рис. 1. Определение топографии V(D)J генных реанжировок для поликлональных образцов В-клеток: *Линии 1, 6–11* – результаты генных реанжировок для исследуемых образцов от практически здоровых добровольцев: *Линия 2* – Поликлональный контроль, *Линия 3* – клональный контроль. *Линия 4* – стандартный маркер молекулярного веса с шагом в сто оснований; *Линия 5* – дополнительный контроль из ПЦР-продуктов housekeeping-генов в 96, 199, 299, 399, 608 пар оснований. На правой электрофореграмме отражена непосредственно яркость исследованных полос

ций для каждой отдельной клетки – будут различны (рисунок 1). Здесь ПЦР с детекцией в геле выступает, как полуколичественный метод с возможностью оцифровки данных. При оценке клонального статуса как в оптимум-группе, так и у пациентов с мононуклеозом и хроническим вирусным гепатитом С преобладала поликлональная картина (рисунок 1). Среди здоровых добровольцев ряд проб имел определённые черты клональности, не сопровождающиеся, тем не менее, выраженными отклонениями в абсолютном количестве В-лимфоцитов, т. е. цитометрически клональность не обнаруживалась тоже. Из этого следует, что активность иммуноферментов оказывается наиболее вариабельным признаком, отражающим индивидуальные вариации исследуемых.

Активность цитидиндезаминазы у пациентов с пневмонией (эпидсезон гриппа 2012–13 гг.). В 2010–11 гг. при оценке результатов противогриппозной иммунизации среди здоровых добровольцев была выявлена группа испытуемых со сниженным протективным титром, что может быть связано не с малым уровнем специфических антител, а с меньшей их афинностью, но при том же их количестве [14]. Была выдвинута гипотеза о том, что для ряда инфекций, включая гриппозную, иммунодостаточная популяция может содержать «скрытую» группу риска тяжёлого течения заболевания и летальных осложнений [2].

В клинической практике, к сожалению, не всегда удаётся установить последовательный этиопатогенез развития пневмонии наличие возможного

РЕПОЗИТ

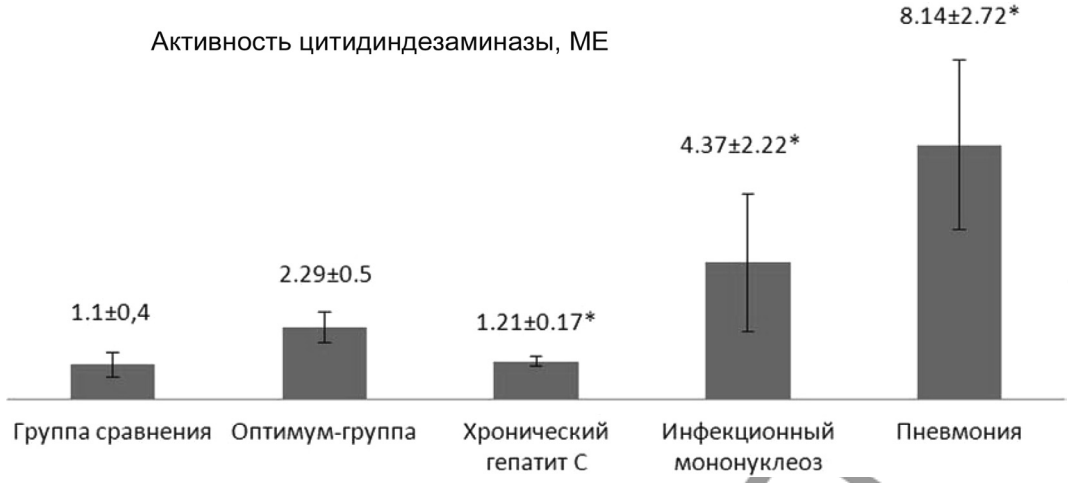

Рис. 2. Сравнительная активность цитидиндезаминазы (* – статистически значимый уровень различий p = 0,05 как с группой сравнения, так и с оптимум-группой)

вирусного патогенна в этиологии ОРИ, предшествующей часто поражению нижних дыхательных путей, возможность первично вирусного поражения лёгких, собственно бактериальный агент, возможность на определённой стадии вирусно-бактериальной микст-инфекции. По этому, пациенты с пневмонией, развившейся в сезон эпидемии гриппа рассматривались нами, как группа риска по наличию общего недифференцируемого (вариабельного) иммунодефицита с основной причиной именно в недостаточности функции цитидиндезаминазы. Предполагалось, что данная недостаточность может выражаться в сниженной (или отсутствующей) активности цитидиндезаминазы даже на фоне остро-воспалительного заболевания. Тем не менее, напротив, ни у одного из данных пациентов не было выявлено ни отсутствия ферментативной активности, ни даже её снижения. Активность цитидиндезаминазы при пневмонии, как и при инфекционном мононуклеозе оказалась высокой в сравнении с контрольной группой (рисунок 2). Причём достоверные различия выявлены как для группы сравнения так и для оптимум-группы. Напротив, пациенты с диагнозом хронического гепатита С имели низкие уровни активности цитидиндезаминазы, что может быть связано в том числе с терапией рибовирином, либо со снижением уровней сывороточного цитидина в результате повышенной вирусной репликации.

Таким образом, именно активность иммуноферментов оказывается наиболее вариабельным признаком, отражающим индивидуальные особенности ответа на инфекцию и имеет потенциал биомаркера для поиска пациентов с риском скрытой иммунонедостаточности, не выявляемой при стандартном алгоритме оценки иммунного статуса методами гемограммы, проточной цитометрии и даже при оценке клонального статуса реанжировок генов иммуноглобулинов методом ПЦР. Несмотря на чрезвычайную биологическую роль цитидиндезаминазы и ряд важных диагностических находок, связанных с изменением её активности, данное исследование так и не стало рутинным [9]. Это, по нашему мнению, связано с рядом следующих причин: 1) отсутствие чётких границ для определения нормальных значений активности этого фермента; 2) учёт повышения/понижения активности без понимания иммунологических причин этих явлений; 3) сложная и многоступенчатая регуляция активности цитидиндезаминазы, как одного из самых значимых биологических мутагенов; 4) активность цитидиндезаминазы рассматривалась обычно только в контексте того патологического состояния, где было выявлено маркерное значение, и вне основной иммунологической роли – регуляции клональной экспансии В-лимфоцитов и соматического мутагенеза [5]. По литературным данным известно, что активность цитидиндезаминазы может ощутимо колебаться в зависимости от пола, возраста и даже суточных циркадных ритмов [2, 9]. При сочетании комплекса этих факторов с инфекционной патологией происходят дополнительные трансформации ферментативной активности, причём не всегда строго линейно [2]. Создание выборки по оптимизационному принципу из сравнительно здоровых индивидов одного пола и возраста должно было с одной стороны помочь определить наиболее узкую границу ферментативной активности, а с другой – оценить вариабельность индивидуальных различий при «прочих равных». Само абсолютное значение ферментативной активности, представленное довольно низкими уровнями обусловлено, вероятно, природой и функцией данного фермента [3, 4, 5]. Обладая высокой мутагенной активностью и будучи одним из основных эндогенных биологиче-

Репозиторий БГ

ских канцерогенов цитидиндезаминаза в активном виде локализуется, в основном, на внешней поверхности ядерной мембраны. Внеклеточная фракция либо участвует в деградации свободного цитидина, либо может появляться, как результат индукции чужеродным агентом.

Литература

1. *Янович*, О. О., Титов Л. П., Щерба В. В. Активность аденозиндезаминазы крови при инфекционном мононуклеозе // Здравоохранение. – 2012. – № 12. – С. 17–19.

2. *Павлов*, К. И., Титов Л. П., Бутько Л. В. Активность ферментов-индукторов соматических гипермутаций в спленоцитах мышей линии CB57/BL, амниотической и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов // Сборник научных работ ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Минск, 2013, стр. 328–336.

3. *Титов* Л. П., Карпов И. А. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология. Медицинский журнал № 1/2007. – Минск, 2007.

4. *Титов*, Л. П. Вирусы и эукариотические клетки: стадии взаимодействия, стратегии экспрессии геномов, репродукция и исходы вирусной инфекции. Медицинский журнал № 1/2008. – Минск, 2008.

5. *Chiu,* Ya-Lin, Warner C. G. APOBEC3G: an intracellular centurion // Phil. Trans. R. Soc. B (2009) Vol. 364. P. 689–700.

6. *Титов,* Л. П., Столярова Т. А., Столярова Е. А. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ нуклеатидных замен в CDR и FRфргментах в VH генах иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах. Вести НАН РБ. Медицинская серия. – 2010. – № 3. – С. 10–18.

7. *James*, I. T. et al. Determination of serum cytidine deaminase activity using ion-pair reversed-phase liquid chromatograp. J. Chromatogr. 1989 Oct 27. – Vol. 495. – P. 105–12.

8. *Thompson,* P. W. et al. Circadian rhythm of serum cytidinedeaminase in patients with rheumatoid arthritis during rest and exercise.// Annals of the Rheumatic Diseases 1989; Vol. 48: 502–504.

9. *Abdulsamie,* H. et al. Cytidine Deaminase activity in breast cancer. Medical Journal of Babylon, 2004. Vol. 1. P. 32–39.

10. *Langerak,* A. W., Jacques J. M. van Dongen. Multiple clonal Ig/TCR products: implications for interpretation of clonality findings // Jornal Hematopathology, 2011. P. 50–60.

11. *Miller,* J. E. et al. An automated semiquantiative B and T cell clonality assay. Mol. Diag. 1999, 4(2). P. 101–117.

12. *Matsuda,* F. et al. The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus// J. Exp. Med. 188. 1998. P. 2151–2162.

13. *Givol,* D., et al. Diversity of germ-line immunoglobulin VH genes. // Nature 292. 1981. P. 426–430.

14. *Дашкевич*, А. М. и др. Безопасность и эффективность вакцины «Флюваксин» при иммунизации военнослужащих. Здравоохранение № 12. 2011. С. 36–40.

Поступила 13.08.2014

РИЗ БГМУ