

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ В ЦИТОЗОЛЕ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШИ С ПОМОЩЬЮ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОК

Прохоцкая В.А., Ленкова А.А., Павлов К.И.

Белорусский государственный медицинский университет,
Кафедра микробиологии, иммунологии, вирусологии
г. Минск

Ключевые слова: гены иммуноглобулинов, цитидиндезаминаза, спленоциты

Резюме: в данной работе приведены методические подходы и результаты исследования внутриклеточной активности фермента индуктора соматических гипермутаций - цитидиндезаминазы и провосполительного цитокина – фермента аденозиндезаминазы. Проведено сопоставление уровней ферментативной активности в плазме и цитозоле. Сделав вывод о том, что уровни активности цитидиндезаминазы плазмы и лизата сопоставимы, тогда как внутриклеточная активности цитидиндезаминаза явно превышает плазменный уровень.

Resume: in this work we present the methodological approaches and the results of a study of the intracellular activity of the enzyme inducer of somatic hypermutation – cytidine and enzyme adenosine deaminase. A comparison of the levels of enzyme activity in plasma and cytosol. Having concluded that cytidine deaminase activity levels comparable to the lysate and plasma, where the intracellular activity cytidindeaminase clearly exceeds plasma levels.

Актуальность. AID — белок (цитидиндезаминаза), инициирующий переключение изотипов иммуноглобулинов и соматическую гипермутацию путем конвертации цитозина в урацил в S- или V-регионах соответственно. При дефиците AID выявляют отсутствие или очень низкий уровень IgG, IgA и IgE, при нормальном или повышенном содержании IgM. У больных гуморальный ответ ограничен IgM-изотипом без изменения аффинитета после повторной иммунизации.

При дефиците цитидиндезаминазы (AID) у пациентов развиваются тяжелые рецидивирующие инфекции респираторного и пищеварительного тракта. Рецидивирующие инфекции приводят к развитию хронических синуситов и бронхоэктазов. Поражения пищеварительного тракта лямблиями могут быть причиной хронической диареи. Инфекционные заболевания ЦНС вызывают *Haemophilus influenzae* и *Herpes Simplex*. Пациенты не чувствительны к оппортунистическим инфекциям, например *Pneumocystis jiroveci*. У 69% пациентов развивается лимфоидная гиперплазия, обусловленная антигенной стимуляцией и пролиферацией В-клеток в отсутствие эффективного синтеза антител. В 75% случаев лимфоидная гиперплазия уменьшается в результате лечения внутривенными иммуноглобулинами. Аутоиммунные нарушения возникают у 21% пациентов и включают аутоиммунные гепатиты, гемолитическую анемию, тромбоцитопению, болезнь Крона, увеиты, хронический активный гепатит, сахарный диабет 1-го типа. У пациентов выявляют аутоантитела IgM-изотипа.

Поэтому важное значение играет изучение данного фермента. Известно, что молекулярно-генетические исследования количественного характера могут не

отражать итоговую ферментативную активность цитидиндезаминазы из-за сложного механизма посттрансляционной активации и ступенчатой регуляции активности этого фермента. По этой причине значительный интерес представляют биохимические тесты непосредственно отражающие трансформацию субстрата *invitro* [5].

Цель: установление базального значения внутриклеточной активности цитидиндезаминазы в цитозолеспленоцитов мышей C57BL/6 при низкотемпературной дезинтеграции клеток

Задачи: определить внутриклеточную активность аденозиндезаминазы и цитидиндезаминазы в цитозоле спленоцитов, сравнить полученные значения с их активностью в плазме.

Материалы и методы. Первым этапом исследования явилась гомогенизация органа и получение клеточной суспензии с фиксированным числом клеток. Применение счётной камеры с сеткой Горяева позволяет производить подсчёт числа клеток с относительно высоким уровнем точности. При исследовании в одной группе из 10 мышей лизат готовился из суспензии 10 млн. клеток/ мл фосфатно-солевого буфера, в другой суспензия представляла 50 млн. спленоцитов на мл. Наиболее простым и технически доступным способом разрушения отдельных клеток в суспензии является метод трехкратного замораживания оттаивания. Ультразвуковая дезинтеграция может сопровождаться нарушением четвертичной белковой структуры исследуемых энзимов. Полученная клеточная суспензия имела бледно-розовый цвет и не влияла значительно на общую оптическую плотность реакционной смеси.

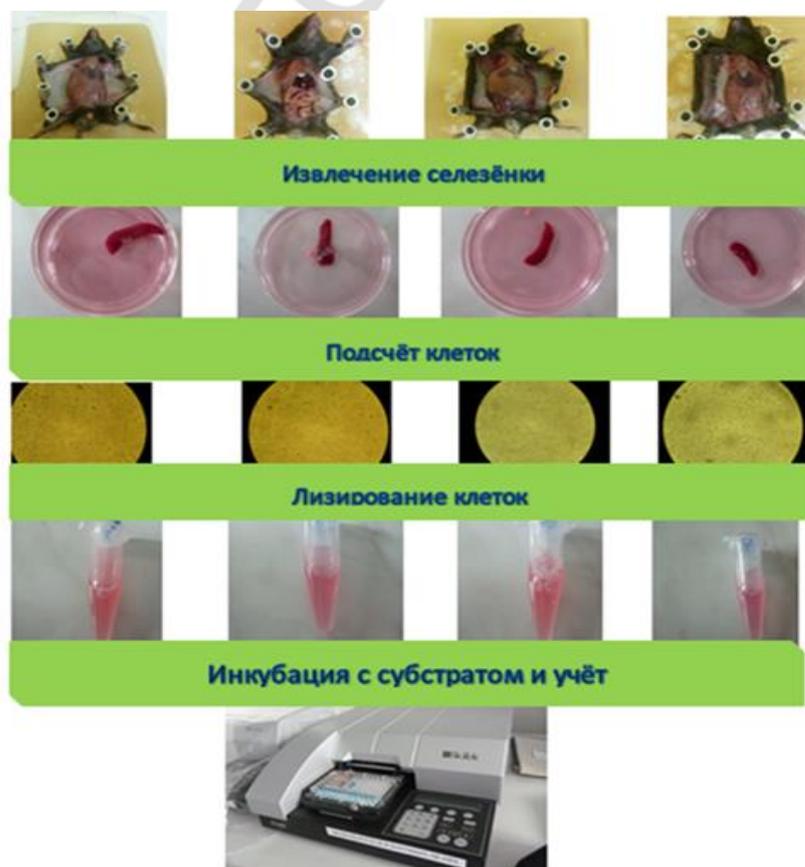


Рис. 1. – Этапы исследования внутриклеточной активности цитиндиндезаминазы в спленocyтaх мышей

Характеристика суспензии спленocyтoв, образуемая при механической дезинтеграции органа, производилась на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Исследовались параметры прямого и обратного светорассеяния. Жизнеспособность клеток оценивалась по инкорпорации пропидия йодида. Для учёта активности ферментов использован индофенольный колориметрический тест, как описано ранее [1,3] с длительной инкубацией в течение 20-22 часов в термостате при 37 °С. В качестве субстратов использовались растворы двух нуклеозидов – цитидина и аденозина.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 10 for Windows и Microsoft Excel. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение.

Большинство клеток полученной суспензии спленocyтoв при цитофлуориметрическом исследовании имели лимфоцитоподобные параметры светорассеяния. Часть популяции имела более высокую зернистость и представляла фракции эозинофилов и нейтрофилов. Суспензия спленocyтoв содержала также значительную примесь эритроцитов, выявляемых морфологически. В предшествующих опытах жизнеспособность клеток суспензии варьировала в пределах 10-30 % популяции.

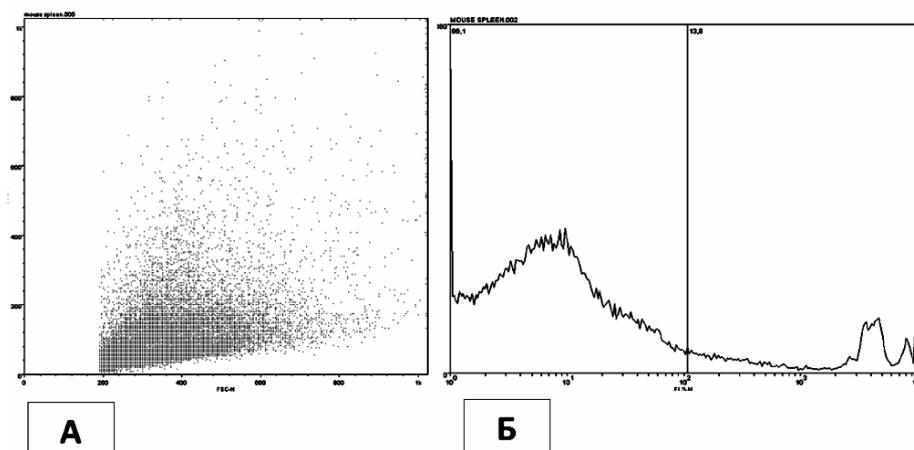


Рис. 2. - А: показана стандартная картина прямого и бокового светорассеяния для популяции спленocyтoв мыши, отмечается явное преобладание лимфоцитоподобных морфологических элементов; Б: черта отделяет мёртвые клетки с большей яркостью по FL3 каналу, активно инкорпорирующие пропидий йодид, которых при заборе и разрушении органа стало 13,6 %.

Низкотемпературная дезинтеграция клеток позволила сократить время приготовления гомогенизата по сравнению с использованием стандартной морозильной камеры с максимальной температурой заморозки -25 °С. Использование более низкой температуры и быстрой кристаллизации цитозоля позволило эффективно получить клеточный гомогенизат с выделением цитозоля.

Соотношение показателей активности внутриклеточных дезаминаз адекватно данным, получаемым для плазмы и функциональной роли исследованных ферментов.

Аденозиндезаминаза в цитозольной фракции спленоцитов характеризовалась значительно большей активностью, чем цитидиндезаминаза. Первоочередная функция аденозиндезаминазы – биodeградации свободного аденозина и участие в энергозначимом аденилатном метаболическом пути. Данный фермент выполняет функции медиатора воспаления, но не является биологическим мутагеном, а значит и не имеет такой сложной системы регуляции и ограничения активности, как цитидиндезаминаза.

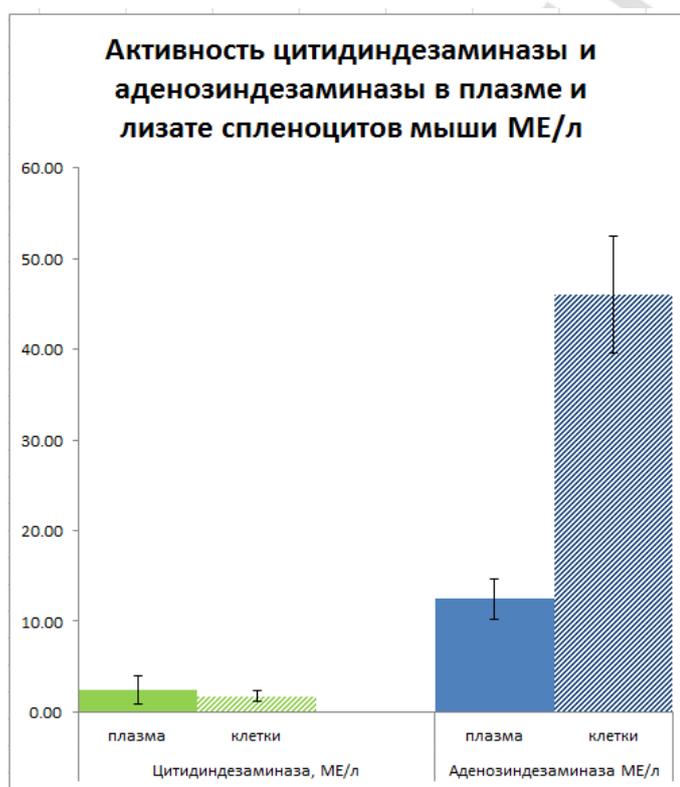


Рис. 4. -Соотношение активностей цитидин- и аденозиндезаминазы в плазме мышей и цитозоле клеток

Сопоставление уровней ферментативной активности в плазме и цитозоле позволяет сделать вывод о том, что массивный лизис клеток не может привести к многократному повышению активности цитидиндезаминазы в плазме, в отличие от аденозиндезаминазы. Повышение активности плазмы по аденозиндезаминазе в 2-4 раза является одним из маркеров туберкулёзной этиологии плеврита и используется как стандартизированный диагностический показатель.

Заключение

1. Активность внутриклеточной цитидиндезаминазы для суспензии цитозоля из 50 млн. клеток/мл составила $1,71 \pm 0,62$ ME. Для аденозиндезаминазы – $46,06 \pm 6,48$ ME.

2. Уровни активности цитидиндезаминазы плазмы и лизата сопоставимы, тогда как внутриклеточная цитидиндезаминаза явно превышает плазменный уровень.

3. Однократное замораживание в низкотемпературной морозильной камере позволила добиться практически стопроцентной дезинтеграции клеток

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. Титов Л. П., Столярова Т. А., Столярова Е. А. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ нуклеотидных замен в CDR и FRфрагментах в VH генах иммуноглобулинов при гепатите С, криоглобулинемии и лейкозах.// Вести НАН РБ. Медицинская серия.- 2010.-№3. стр. 10-18.

3. Таганович А.Д. и др. Способ диагностики плеврита туберкулёзной этиологии на основании определения активности аденозиндезаминазы в сыворотке крови и в плевральной жидкости. // Инструкция Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Регистрационный No 015-0308, Минск, 2008.

4. Thompson P. W. , James I. T., Wheatcroft S., Pownall R., Barnes C. G. Circadian rhythm of serum cytidinedeaminase in patients with rheumatoid arthritis during rest and exercise.// Annals of the Rheumatic Diseases 1989; 48: 502-504