

# **ВЫЯВЛЕНИЕ ИНДИВИДОВ С ВЫСОКИМИ ЗНАЧЕНИЯМИ ФЕРМЕНТА ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

К. И. Павлов, Л. П. Титов, Т. В. Зновец, Т. А., Рогачёва, Л. А. Анисько,  
С. В. Жаворонок

*УО Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,  
Республика Беларусь*

*ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и  
микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь*

*УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», г. Минск,  
Республика Беларусь*

*УЗ «3-я городская клиническая больница имени Е.В. Клумова», г. Минск,  
Республика Беларусь*

**Резюме:** Используя образцы сыворотки и плазмы от пациентов с хроническими персистирующими формами вирусной инфекции (ХВГС, ВИЧ) исследованы субстратная специфичность, кинетика ферментативной активности и оптимальные параметры индофенольного колориметрического теста. На примере образцов с наибольшей активностью цитидиндезаминазы установлено, что для исследования активности фермента оптимальным соотношением пробы (как сыворотки, так и плазмы), субстратного раствора, фенольно-нитропруссидного раствора и щелочного раствора гипохлорита является 1:40:120:120, соответственно.

**Ключевые слова:** цитидиндезаминаза, ВИЧ, хронический вирусный гепатит С, индофенольная колориметрическая реакция

**Summary:** Using serum and plasma samples from patients with chronic persistent forms of viral infections (HCV, HIV) were investigated the substrate specificity, kinetics of enzyme activity, and optimal parameters of indophenol colorimetric test for cytidine deaminase measurement. On the example of cytidine deaminase highest activity samples was found that optimum ratio of the sample (such as serum and plasma) substrate solution, the phenol-nitroprusside solution and the alkaline hypochlorite solution is 1: 40: 120: 120, respectively.

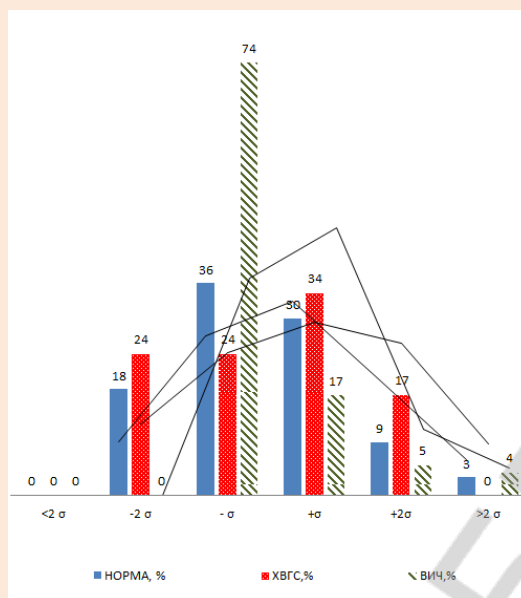
**Key words:** cytidine deaminase, HIV, HCV-infection, indophenol colorimetric test

**Введение.** Исследование цитидиндезаминазы – полифункционального ферментов-регулятора, задействованного во множестве механизмов клеточной физиологии и иммунного ответа, ведётся на протяжении более чем 30-ти последних лет [1]. Первоначально, отдельное исследование сывороточной цитидиндезаминазы было предложено для ранней диагностики гестозов в 1984. Р. W Thompson исследовал вариации цитидиндезаминазы у пациентов с ревматоидным артритом. Далее был сделан ряд находок по уровням ферментативной активности при ряде вирусных и онкологических заболеваний [2]. Среди методов изучения активности ферментов цитидиндезаминазы значительный удельный вес по-прежнему занимают биохимические спектрофотометрические и колориметрические тесты [2]. Длительное применение двух этих методик объясняется определённой «окончателюстью» результатов: ни генотипирование (ПЦР, SNP), ни изучение количества транскрибируемого продукта методом ПЦР в реальном времени не отображают реальной функциональной активности фермента по отношению к субстрату. Ранее было выявлено, что активность цитидиндезаминазы в плазме здоровых добровольцев характеризовалась низким значением и составила  $1,82 \pm 0,36$  МЕ [3, 4]. Показатель характеризовался высокой воспроизводимостью в каждой пробе и параметрическим распределением внутри всей выборки [4]. В общем, из всего массива обследованных была выявлена небольшая группа индивидов с крайне высокими значениями дезаминазной активности в плазме, в сравнении с остальными [3]. Был сделан вывод о том, что сама методика индофенольной колориметрической реакции нуждается в дальнейшей оптимизации для лучшего выявления проб с интенсивным дезаминированием цитидина.

**Материалы и методы.** С помощью индофенольного колориметрического теста были исследованы образцы *плазмы* пациентов с диагнозом хронического гепатита С в стадии обострения мужского и женского пола в широком возрастном диапазоне от 27 до 70 лет, n=29. Из медицинской карты зафиксированы сведения о вирусной нагрузке на момент

исследования и в динамике, лейкоцитарная формула, данные биохимического исследования крови и получаемые медикаменты. Группа характеризовалась широким диапазоном вирусной нагрузки, все пациенты получали препарат рибавирин. Дополнительно, для исследования динамики дезаминации было исследовано 20 образцов *сыворотки* беременных-носителей вирусного гепатита С. Также активность цитидиндезаминазы была исследована у 77 пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекция, без учёта клинических данных. Из них 7 проб с наиболее высокой активностью были отобраны для исследования субстратной специфичности и соотношения объёмов реакционной смеси. Статистический анализ включал следующие методы: а) метод вариационной статистики с расчетом средних величин (М), стандартных ошибок средних, уровней значимости (р); б) однофакторный корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции; в) для сравнения активности фермента проводилось сопоставление дисперсий и процентного распределения значений ферментативной активности в диапазонах  $\pm \sigma$ ,  $\pm 2 \sigma$  стандартных квадратических отклонений и задания тренда путём линейного фильтра.

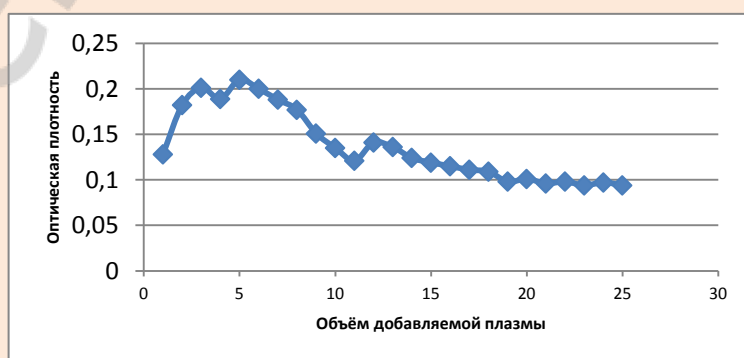
**Результаты и обсуждение.** Выявленная в группе пациентов с хроническим гепатитом С активность цитидиндезаминазы ниже как по абсолютному значению ( $1,21 \pm 0,17$  МЕ), так и по амплитуде индивидуальных колебаний внутри когорты в сравнении с группой здоровых добровольцев. Тем не менее, данная выборка также носила черты параметрического распределения. Не удалось выявить зависимость между активностью цитидиндезаминазы в плазме и вирусной нагрузкой у данных пациентов. ВН колебалась в широком от индивидов с отсутствием выявляемых вирусных частиц, либо имеющих крайне малое их количество (в пределах 3 000 частиц на мл) до крайне высокой вирусной нагрузки порядка 300 млн. инфекционных частиц на мл. Ещё более низкая, практически минимальная активность цитидиндезаминазы была выявлена у пациентов с ВИЧ-инфекцией ( $0,54 \pm 0,21$  МЕ/л), причём в данной группе обнаружены пациенты с нулевой активностью фермента, чего не отмечалось более не в каких других когортах. Учитывая низкие значения ферментативной активности цитидиндезаминазы, полученные для групп здоровых добровольцев, пациентов с ХВГС-инфекцией и ВИЧ и вариацию отличий в крайне низких диапазонах (порядка 1 МЕ/л и ниже) была исследована также внутригрупповая дисперсия для данных когорт (**Рисунок 1**)



**Рисунок 1 – Внутригрупповая дисперсия ферментативной активности цитидиндезаминазы и аденозиндезаминазы для пациентов с ХВГС-инфекцией и ВИЧ в сравнении с группой здоровых добровольцев**

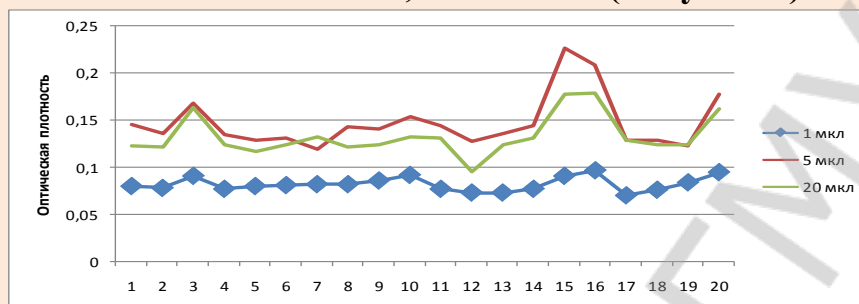
Для группы здоровых добровольцев 66 % исследованных на активность цитидиндезаминазы укладывались в диапазон  $\pm\sigma$  относительно среднего и 97 % - в диапазон  $\pm 2\sigma$ , причём, распределение равномерное в обе стороны. При хроническом вирусном гепатите С имеется некоторое преобладание в сторону плюсовых значений, но распределение в целом, также равномерное. Напротив, для ВИЧ инфекции отмечается резкий крен в сторону меньшего, чем среднее значений активности 74 % исследованных находятся в группе - $\sigma$ . -2 $\sigma$  выходит за пределы положительных значений. Это значит, что основная масса проб имеет низкое значение ферментативной активности, а среднее значение выравнивается за счёт небольшого количества образцов с довольно высоким результатом. Именно эти пробы были исследованы при оценке субстратной специфичности и вариации объёма реакционной смеси.

Для итогового значения ферментативной активности ключевым фактором следует считать соотношение объёмов сыворотки и субстратного раствора. Оптическая плотность итогового индофенольного раствора не прямо пропорциональна объёму добавленной плазмы (**Рисунок 2**).



## Рисунок 2 – Изменение оптической плотности субстратного раствора в зависимости от объёма добавляемой плазмы

Для сыворотки обозначилась та же тенденция: внесение 5 мкл образца давало несколько большие значения, чем 20 мкл (Рисунок 3).

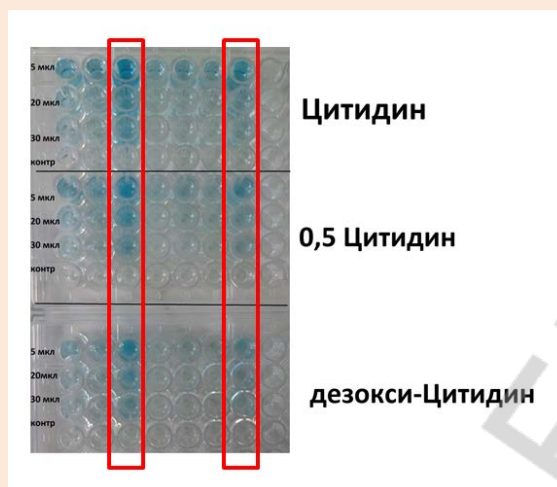


## Рисунок 3 – Сопоставление оптической плотности у 20 образцов от пациенток с диагнозом вирусного гепатита С во время беременности

Показатели оптической плотности для 20 и 5 мкл характеризовались значительным подобием и преобладанием над малым объёмом субстрата. Данная закономерность отмечается, например, в работе [5], где оптическая плотность субстратных растворов у индофенольного колориметрического теста также снижалась при внесении излишних объёмов сыворотки. Связано это может быть со многими причинами: ионы магния могут блокировать индофенольную реакцию, ЭДТА в качестве антикоагулянта также способно инактивировать каталитическую активность нитропруссид натрия [5]. Непосредственно сам свободный аммиак подвергается утилизации ферментами плазмы. Цитидин, помимо дезаминации, может иметь дополнительные пути биodeградации. Таким образом, изменение объёма сыворотки приводит к значительным изменениям в абсолютных числах ферментативной активности.

В таких условиях необходимо проверить специфичность реакции. Наилучшим доказательством действительной дезаминационной активности будет исследование динамики ферментативного процесса, т. е. нарастание оптической плотности с течением времени. Цитидиндезаминаза характеризуется низкой кинетикой, или «оборотом», поэтому обычно используются длительные инкубации (18 часов и выше) [6]. Для 20-ти ранее обследованных по объёму проб была исследована оптическая плотность в динамике: 5,5 – 18 – 24 часа. Получено последовательное возрастание среднего значения оптической плотности (выше уровней спонтанной дезаминации): 0,099 – 0,147 – 0,156. Коэффициент корреляции между отличался высоким значением:  $R=0,83$  для значений 5,5 и 18 часов;  $R=0,74$  для 18 и 24 часов;  $R=0,67$  для 5,5 и 24-х часов, соответственно.

В целом же, индивиды с высоким значением активности цитидиндезаминазы выявляются при самых разнообразных вариациях компонентов индофенольной реакции и времени инкубации (**Рисунок 4**).



**Рисунок 4 – Пробы с наиболее интенсивной дезаминазной активностью выявляются при разных вариациях индофенольной реакции**

#### **Выводы:**

1. Для исследования активности цитидиндезаминазы оптимальным соотношением пробы (как сыворотки, так и плазмы), субстратного раствора, фенольно-нитропруссидного раствора и щелочного раствора гипохлорита является 1:40:120:120 (т. е. 5 мкл сыворотки (плазмы) : 200 мкл субстратного раствора : 600 мкл фенольно-нитропруссидного раствора : 600 мкл щелочного раствора гипохлорита).

2. Различимая ферментативная активность проявляется после 5 часов инкубации, однако предпочтительнее длительный вариант.

3. Можно говорить о снижении активности сывороточной цитидиндезаминазы у пациентов с хронической персистирующей вирусной инфекцией (ВИЧ, ХВГС).

#### **Литература**

1. Zan H. Regulation of Aicda expression and AID activity/ H. Zan, P. Casali// Autoimmunity. – 2013 – Vol. 46. – P. 81-99

2. The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA / [Electronic resource] – 2015 – Mode of access: (<http://www.brenda-enzymes.org/>) – Date of access: 30.03.2015

3. Cytidine Deaminase and Adenosine Deaminase Are Highly Sensitive Enzymatic Regulators of Immune Response Intensity and Specificity / L. Titov, K. Pavlov, A. Hancharou, O. Yanovitch, S. Javoronok, L. DuBuske // 2014 Annual Meeting American College of Allergy, Asthma & Immunology Abstract book: Section 2 - P. A48

4. Павлов, К. И. Цитидиндезаминаза и аденозиндезаминаза - ферменты, контролирующие интенсивность и специфичность иммунного ответа: стандартизация

активности в норме и диагностическая значимость при заболеваниях/ К. И Павлов, Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, О. А. Янович, С. В. Жаворонок// Медицинский журнал – 2014. – №4

5. A Note on Serum Nucleotidase Determinations/ A. Belfield, D. M. Goldberg// Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. – 1971 – №5, стр. 197-200

6. Re-evaluation of the colorimetric assay for cytidine deaminase activity/Т. Okamura, К. Kigasava// Prenat Diagn. – 1994 – 14(3), стр. 213-218