

АКТИВНОСТЬ ЦИТИДИНДЕЗАМИНАЗЫ У БЕРЕМЕННЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

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

Повышение сывороточной активности цитидиндезаминазы выявляется при многих осложнениях течения беременности. В то же время, хронический вирусный гепатит С (ХВГС) может сопровождаться снижением активности цитидиндезаминазы. Цель исследования: выяснить, сохраняется ли диагностическая значимость исследования цитидиндезаминазы у беременных с ХВГС-инфекцией. Активность цитидиндезаминазы была исследована с помощью индофенольной колориметрической реакции у 138 беременных с ХВГС, 40 небеременных с ХВГС и 56 здоровых женщин. Наименьшая активность цитидиндезаминазы наблюдалась у небеременных пациенток с вирусным гепатитом С и составила 4.51 ± 85 МЕ/л. Несмотря на персистенцию вируса гепатита С, беременность сопровождалась повышением активности в сравнении с небеременными (6.47 ± 0.51 МЕ/л против 5.75 ± 0.51 МЕ/л). Персистенция вируса гепатита С сопряжена со снижением активности цитидиндезаминазы. У беременных с хроническим вирусным гепатитом С отмечается достоверное повышение активности цитидиндезаминазы в сравнении с небеременными, как здоровыми, так и инфицированными. Повышение цитидиндезаминазы сыворотки сопряжено с повышением печёночных трансаминаз, щелочной фосфатазы и абсолютным числом лейкоцитов. Активность цитидиндезаминазы у беременных с ХВГС имеет потенциал показателя, способного суммировать тяжесть состояния.

Ключевые слова: цитидиндезаминаза, хронический вирусный гепатит С, беременность.

T. V. Znovets, K. I. Pavlov, S. V. Zhavoronok, L. P. Titov

CYTIDINE DEAMINASE ACTIVITY IN PREGNANT WOMEN WITH CHRONIC HEPATITIS C

Elevated serum cytidinedeaminase activity detects in many complications of pregnancy. At the same time, chronic viral hepatitis C may be associated with decreased activity of cytidine deaminase. Aim of the research was to find out whether the diagnostic value of cytidine deaminase activity retained in pregnant women with chronic HCV infection. Cytidine deaminase activity (CDA) was measured using indophenol colorimetric test in 138 pregnant with chronic hepatitis C infection, 40 nonpregnant with chronic hepatitis C and 56 healthy women. CDA lowest activity was observed in non-pregnant patients with hepatitis C and was 4.51 ± 0.85 U. Despite the hepatitis C virus persistence, pregnancy accompanied by an increase in cytidine deaminase activity compared to non-pregnant (6.47 ± 0.51 U versus 5.75 ± 0.51 U). Solitary persistence of hepatitis C is associated with a decrease in cytidine deaminase activity. Pregnant women with chronic hepatitis C was a certain increase in the activity of cytidine deaminase in comparison to non-pregnant, both healthy and infected. Increasing serum cytidine deaminase is associated with an increase in hepatic transaminases, alkaline phosphatase, and the absolute number of leukocytes. Cytidine deaminase activity has the potential to be the summarizing indicator for the severity of clinical state in pregnant women with chronic hepatitis C infection.

Key words: Cytidine deaminase, chronic HCV infection, pregnancy.

Оригинальные научные публикации

Фермент цитидиндезаминаза имеет многочисленные эпигенетические и иммунологические функции, среди которых участие в репарации и деметилировании ДНК, соматические гипермутации генов иммуноглобулинов, переключение класса синтеза антител. В свете этого, активность цитидиндезаминазы являлась предметом ряда исследований на протяжении последних 30 лет [2]. Первоначально, отдельное исследование сывороточной цитидиндезаминазы было предложено для ранней диагностики гестозов D. D. Jones коллегами в 1982-м году [3]. Было выявлено, что ревматоидный артрит сопровождается значительным повышением уровня сывороточной цитидиндезаминазы (17 МЕ/л и выше), пропорциональным активности воспалительного процесса. Согласно AbdulsamieH, повышение активности цитидиндезаминазы свыше 14 МЕ/л может быть эффективным маркером рака груди [4]. Вирусы гепатита С (ВГС), ВИЧ, вирус Эпштейна-Барр и, по ряду данных, вирус гриппа имеют опции, позволяющие модифицировать соматический мутагенез и активность цитидиндезаминазы, управляя, тем самым, лимфопрлиферативными механизмами в организме хозяина [5]. Так инфекционный мононуклеоз, вызываемый вирусом Эпштейна-Барр, сопровождается часто клональной экспансией мононуклеарных лейкоцитов. Цитидиндезаминаза обладает прямой антиретровирусной активностью при условии высокого внутриклеточного содержания рибонуклеопротеидов и свободной РНКазы. При ВИЧ-ассоциированной активации Т-клеточного роста происходит образование внутривиральных комплексов, содержащих клеточную цитидиндезаминазу. Блокировка интравиральными белками данного механизма приводит к резкому повышению вирусной нагрузки.

Серьёзных диагностических находок, связанных с активностью цитидиндезаминазы следует ожидать именно у пациентов с хронической персистенцией вирусных патогенов, способных модифицировать цитидиндезаминазную активность. Так, было выявлено, что активность цитидиндезаминазы у пациентов с хроническим персистированием как вируса гепатита С, так и вируса иммунодефицита значительно снижена в сравнении как со здоровыми добровольцами, так и с пациентами, страдающими острыми формами воспалительной патологии (инфекционный мононуклеоз, пневмония) (Павлов К. И., Титов Л. П., 2013) [1]. Эти результаты могут привести к ряду парадоксальных выводов: для ряда диагностических ситуаций возможна определённая компенсация ферментативной активности. Повышение сывороточной ферментативной активности, связанное, например, с повреждением клеток трофобласта или апоптозом лимфоцитов, может быть нивелировано за счёт персистенции вируса. Поэтому, целью исследования было оценить сочетание фактора беременности и персистенции ВГС на активность цитидиндезаминазы.

Материалы и методы

Исследуемые группы. Активность цитидиндезаминазы была исследована у 138 беременных с хроническим вирусным гепатитом С (16 из них имели ко-инфекцию ВИЧ/ВГС). У пациенток были исследованы сывороточные показатели аспартатаминотрансферазы, аланиноамино-трансферазы, щелочной фосфатазы, общего белка, показатели формулы крови. Для сравнения нормальная активность сывороточной цитидиндезаминазы была исследована у 56 здоровых женщин в возрасте 19–59 лет (средний возраст – 37 ± 3 года), не имеющих острых и системных хронических заболеваний. Также активность цитидиндезаминазы исследовалась у 40 небеременных пациенток с вирусным гепатитом С.

Учёт ферментативной активности. Активность цитидиндезаминазы измерялась в индофенольной колориметрической реакции, используя стандартный раствор цитидина. Для сравнения был использован раствор атипичного нуклеозида гемцитабина в той же концентрации (10,5 ммоль/л) [1, 6]. Использована длительная инкубация (18 часов). Учёт реакции проводился в 96-луночном планшете на ИФА-мультиканале с 300 мкл реакционной смеси [6].

Статистический анализ включал следующие методы:

- 1) метод вариационной статистики с расчетом средних величин (M), стандартных ошибок средних, уровней значимости (p);
- 2) однофакторный корреляционный анализ с расчетом коэффициента регрессии;
- 3) при межгрупповом и внутригрупповом сравнении по долям рассчитывалось отношение шансов (OR) и его 95% доверительный интервал (CI).

Результаты и обсуждение

Среди трёх исследованных групп наименьшая активность цитидиндезаминазы наблюдалась у небеременных пациенток с вирусным гепатитом С и составила $4,51 \pm 0,85$ МЕ/л. Гепатит С и беременность дали наибольшее среднее значение ($6,47 \pm 0,51$) МЕ/л. Тем не менее, вариация признака среди 3-х групп составила чуть более 2-х МЕ/л.

Дисперсия признака в трёх группах была разной: для здоровых индивидов она носила выраженные черты нормального распределения. Число лиц в диапазоне от среднего до $+\sigma$ практически совпало с теми, у кого она находилась в диапазоне от среднего к $-\sigma$. Индивидов с нулевой ферментативной активностью не было выявлено, и все пробы с низкой активностью (16%) находились в интервале

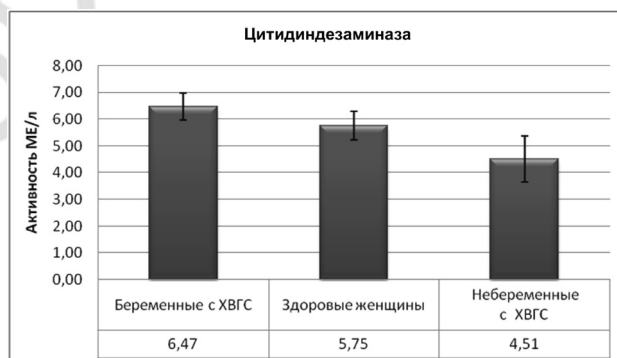


Рисунок 1. Активность цитидиндезаминазы: наименьшая активность в группе небеременных женщин с вирусным гепатитом С, наибольшая – у беременных с вирусным гепатитом С

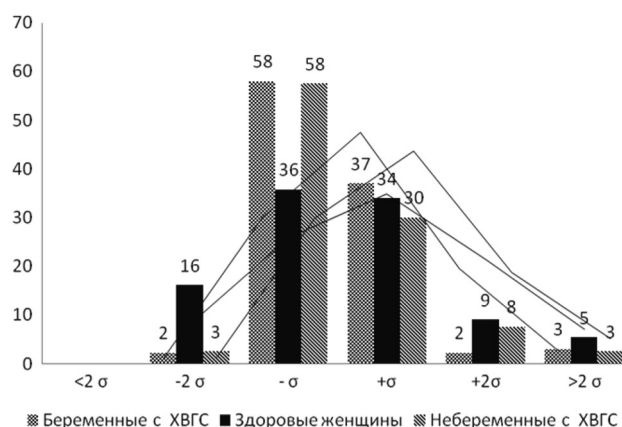


Рисунок 2. Дисперсия в исследованных группах

от $-\sigma$ до -2σ . Три пробы имели ферментативную активность выше, чем среднее $+2\sigma$. Однако в абсолютных значениях они также не отличались высокими уровнями (10.37, 10.46 и 10.90 МЕ/л соответственно). Для беременных и небеременных с вирусным гепатитом С основной массив проб имел значения ферментативной активности внутри диапазона от $-\sigma$ до среднего значения (по 58%). В два раза меньше индивидов попало в интервал $+\sigma$ от среднего.

Нулевых значений активности не выявлено ни в одной из этих групп. Среди проб с интенсивно высокой активностью ($+2\sigma$ от среднего) максимальное значение было показано у беременной с гепатитом Си составило 31.12 МЕ/л. Следующая по активности проба в данной группе была почти в 2 раза меньше по значению (16 МЕ/л). Для небеременных женщин инфицированных вирусом гепатита С одна проба отличалась активностью 17.58 МЕ/л. Следующая за ней – характеризовалась куда более низким значением: 9.23 МЕ/л. Также в диапазон от $+\sigma$ до $+2\sigma$ вошли ещё 2 пробы 8.17 и 8.79 МЕ/л соответственно. В целом же, можно отметить, что подобные значения не были характерны для этих пациенток, так как максимальная проба в области М $+\sigma$ была 5.98 МЕ/л. Основной же массив образцов укладывался в диапазон М $-\sigma$ со средней активностью в 3.18 МЕ/л. Таким образом, в группе здоровых женщин среднее значение сформировано за счёт значений активности представленных нормальным распределением признака. Для беременных с хроническим гепатитом С и инфицированных вирусом небеременных пациенток основной массив проб попадает в диапазон значений $-\sigma$ от среднего, среднее же значение компенсируется небольшим процентом проб с относительно высокой активностью.

Для обоих субстратов, на которых исследовалась активность цитидиндезаминазы: цитидина и гемцитабина, значения ферментативной активности были сопоставимы, причём для группы беременных с вирусным гепатитом С активность по гемцитабину была выше, чем по цитидину (8.03 МЕ/л против 6.47 МЕ/л) при высоком значении коэффициента регрессии ($R = 0,82$).

В зависимости от уровня активности цитидиндезаминазы все беременные с вирусным гепатитом С были разделены на 2 группы:

- первая группа – 80 беременных с активностью цитидиндезаминазы до 6.47 МЕ/л, т. е. ниже среднего значения;
- вторая группа – 58 беременных с активностью цитидиндезаминазы 6.47 МЕ/л и выше, т. е. выше среднего значения.

Было выявлено, что уровень активности цитидиндезаминазы связан с активностью аминотрансферазы щелочной фосфатазы. Активность аминотрансфераз достоверно выше во 2-й группе (АлАТ 51.26 \pm 23.18 ЕД/л и АсАТ 48.73 \pm 15.31 ЕД/л) при сравнении с 1-й группой (АлАТ 20.60 \pm 3.16 ЕД/л и АсАТ 26.53 \pm 2.82 ЕД/л). Повышенная активность аланиноаминотрансферазы (более 53 ЕД/л) зарегистрирована у 2 (2,44 \pm 1,7%) беременных 1-й группы и у 15 (26,77 \pm 5,92%) пациенток 2-й группы (OR = 14,634, 95% CI 3,192–67,092). Средние значения АлАТ у данных пациенток составили 68,15 \pm 7,28 ЕД/л и 144,12 \pm 70,21 ЕД/л в 1-й и 2-й группах соответственно. Повышенная активность аспартатаминотрансферазы (более 47 ЕД/л) наблюдалась у 3 (3,66 \pm 2,07%) беременных 1-й группы и у 17 (30,36 \pm 6,14%) пациенток 2-й группы (OR = 11,479, 95% CI 3,173–41,530). Средние значения АсАТ у данных пациенток составили в 1-й группе 70,1 \pm 16,24 ЕД/л, во 2-й – 105,95 \pm 40,5 ЕД/л. Щелочная фосфатаза, менее чем аминотрансферазы, но всё-таки повышена во второй группе.

Таблица 1. Средняя активность стандартных биохимических показателей в зависимости от уровня активности цитидиндезаминазы, выявленного с использованием цитидина в качестве субстрата

Цитидиндезаминаза – субстрат цитидин		
	1-я группа (ниже среднего значения М)	2-я группа (выше среднего значения М)
АсАТ (ЕД/л)	26.53 \pm 2.82	48.73 \pm 15.31 ¹
АлАТ (ЕД/л)	20.60 \pm 3.16	51.26 \pm 23.18 ²
Щелочная фосфатаза (ЕД/л)	297.49 \pm 38.53	341.76 \pm 53.48 ³
Общий белок (г/л)	63.46 \pm 1.26	62.37 \pm 2.46

Примечание. $p^1 = 0,036$, $p^2 = 0,026$, $p^3 = 0,045$.

Уровень общего белка не показал серьёзных различий в зависимости от активности цитидиндезаминазы.

Сопоставимые значения получены и для активности относительно гемцитабина. В выделенных группах (выше и ниже среднего) высокие значения цитидиндезаминазы также сопряжены с повышением аминотрансфераз и щелочной фосфатазы. Показатели в группах практически синхронны с таковыми для субстрата цитидина.

Таблица 2. Средняя активность стандартных биохимических показателей в зависимости от уровня активности цитидиндезаминазы, выявленного с использованием гемцитабина в качестве субстрата

Цитидиндезаминаза – субстрат гемцитабин		
	1-я группа (ниже среднего значения М)	2-я группа (выше среднего значения М)
АсАТ (ЕД/л)	25,66 \pm 2,43	50,39 \pm 15,56 ¹
АлАТ (ЕД/л)	19,57 \pm 2,70	53,28 \pm 23,53 ²
Щелочная фосфатаза (ЕД/л)	298,3 \pm 38,13	339,84 \pm 53,81 ³
Общий белок (г/л)	63,25 \pm 5,56	63,69 \pm 5,18

Примечание. $p^1 = 0,032$, $p^2 = 0,02$, $p^3 = 0,048$.

Лимфопения (лимфоциты менее 18%) в общем анализе крови достоверно чаще встречалась у беременных 2-й группы (20 (35,71 \pm 6,39%) при сравнении с 1-й группой (12 (14,63 \pm 3,89); OR = 3,241, 95% CI 1,426–7,364). Непосредственно прямая зависимость между активностью цитидиндезаминазы и стандартным биохимическим показателем либо количеством клеток крови была наиболее сильной с абсолютным числом лейкоцитов при использовании цитидина в качестве субстрата для дезаминации. Связь с аминотрансферазами была сильнее, наоборот, при использовании в качестве субстрата раствора гемцитабина.

Таблица 3. Корреляция активности цитидиндезаминазы со стандартными показателями биохимического анализа и гемограммы

Показатель	Коэффициент регрессии, R	
	Цитидиндезаминаза	
	Субстрат-цитидин	Субстрат-гемцитабин
АлАТ(ЕД/л)	0,33	0,43
АсАТ(ЕД/л)	0,38	0,45
Щелочная фосфатаза (ЕД/л)	0,06	0,06
Общий белок (г/л)	0,01	0,03
Лейкоциты*10 ⁹ /л	0,58	0,40
Лимфоциты*10 ⁹ /л	0,12	0,01

□ Оригинальные научные публикации

Несмотря на то, что персистенция вирусного гепатита С связана со снижением активности цитидиндезаминазы, у беременных с хронической инфекцией вирусного гепатита С **отмечается достоверное повышение активности цитидиндезаминазы** в сравнении с небеременными, как здоровыми, так и инфицированными. Повышение активности цитидиндезаминазы сопоставимо с повышением печёночных трансаминаз, щелочной фосфатазы и лейкоцитозом крови. Известно, что повышение активности цитидиндезаминазы предлагалось, как маркёр гестозов и преэклампсии. Williams G. F. и Jones D. D. (1982) в течение 7 лет обследовали 2460 беременных и предложили, что активность свыше 4.8 МЕ/л является фактором развития гестоза и преэклампсии у беременных [3]. Предложено прогностическое значение в 40 МЕ/л, как индикатор крайне высокого риска для плода (Okamura T., Kigasawa K., 1993) [7, 8]. Учитывая снижение активности цитидиндезаминазы, связанное с персистенцией вирусного гепатита С, прогностический уровень у таких пациенток становится ниже. К тому же, важно учитывать ещё и непосредственно вирусное поражение печени, которое ухудшает прогноз. Используя, в основном, индофенольный колориметрический тест, разные авторы использовали определённые вариации в концентрации и соотношении реакционных компонентов. Поэтому однозначно сопоставлять их нельзя. Однако общая тенденция свидетельствует о том, что сывороточная активность характеризуется довольно низкими значениями. Отсутствие активности не характерно. Следует также отметить, что в довольно однородных группах соматически здоровых добровольцев индивидуальная вариабельность довольно высокая [9]. Это также наряду с персистой инфекцией, может влиять на суммарную активность фермента.

Выводы

1. Персистенция вируса гепатита С сопряжена со снижением активности цитидиндезаминазы.
2. У беременных с хроническим вирусным гепатитом С отмечается достоверное повышение активности цитидиндезаминазы

в сравнении с небеременными, как здоровыми, так и инфицированными.

3. Повышение цитидиндезаминазы сыворотки сопряжено с повышением печёночных трансаминаз, щелочной фосфатазы и абсолютным числом лейкоцитов.

4. Цитидиндезаминаза имеет выраженный потенциал, как показатель, способный суммировать тяжесть состояния.

Литература

1. 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. – С. 98–103.
2. APOBEC3G: an intracellular centurion/ Ya-Lin Chiu, C. G. Warner // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2004. – Vol. 364. – P. 689–700.
3. Serum deoxycytidylate deaminase as an index of high-risk pregnancy / D. D. Jones, G. F. Williams // Br J. ObstetGynaecol. – 1982. – Vol. 89 (4). – P. 309–13.
4. Cytidine Deaminase activity in breast cancer / H. Abdulsamie et al. // Medical Journal of Babylon. – 2004. – Vol. 1. – P. 32–39.
5. The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA / [Electronic resource] – 2015. – Mode of access: (<http://www.brenda-enzymes.org/>). – Date of access: 30.03.2015.
6. *Methods of Enzymatic Analysis.* Bergmeyer, H. U. (ed.). – Weinheim: VerlagChemie, 1984. – P. 315–323.
7. *Re-evaluation of the colorimetric assay for cytidine deaminase activity* / T. Okamura, K. Kigasava // PrenatDiagn. – 1994. – 14(3). – С. 213–218.
8. *Deoxycytidylate deaminase in pregnancy* / L. Targett-Adams L., D. D. Jones, G. F. Williams // Clin. Chim. Acta. – 1975. – Vol. 16. – P. 377–82.
9. *Individual Cytidine Deaminase and Adenosine Deaminase Variations in a Highly Immunologically Homogenous Group of Healthy Belarussian Adults* / Leonid P. Titov, K. I. Pavlov, Andrei Y. Hancharou, Lawrence M. DuBuske // Journal of Allergy and Clinical Immunology 02/2015; 135(2): AB16. DOI:10.1016/j. jaci.2014.12.984.