

**УРОВЕНЬ И ФЕНОТИПЫ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА  
У ЛИЦ С ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ  
В КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

*С.Ж. Сыдыкова* – аспирант,

*М.Ж. Алымбаева* – аспирант,

*Н.Н. Бримкулов* – докт. мед. наук, профессор

При изучении уровня и фенотипов альфа-1-антитрипсина (ААТ) у 41 пациента с хроническими обструктивными заболеваниями легких в кыргызской популяции выявлены случаи дефицита альфа-1-антитрипсина.

*Ключевые слова:* дефицит альфа-1-антитрипсина; хронические абструктивные заболевания легких; фенотип; кыргызская популяция.

Дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ) является этиопатогенетическим фактором развития ХОЗЛ с доказанной генетической обусловленностью фермента [1–3]. Подавляя избыточную активность протеолитических ферментов, особенно нейтрофильной эластазы, ААТ защищает ткани организма, в первую очередь – легких, от протеолиза [4, 5]. В европейских странах среди белой популяции частота дефицита ААТ достигает 0,02–0,06% [6, 7]. Исследований ААТ в азиатских популяциях проведено значительно меньше [8, 9]. Однако *de Serres F. заявляет о глобальной распространенности генетического дефицита ААТ* [9].

Кыргызстан отличается от других стран Европейского региона самыми высокими показателями смертности от хронических болезней органов дыхания [10]. Наименее изученной причиной высокой смертности от БОД в Кыргызстане является генетический фактор. Поэтому для республики изучение проблемы дефицита ААТ имеет особое значение.

Цель исследования: изучение уровня и фенотипов ААТ у пациентов с хроническими обструктивными респираторными заболеваниями в кыргызской популяции.

**Материалы и методы исследования.** Пациентов включали в исследование после инфор-

мирования о его целях и сути и письменного согласия на участие. Обследованы 41 пациент кыргызской национальности, из них мужчин – 21 и женщин – 20 (средний возраст  $58,4 \pm 11,9$  лет) с хроническими обструктивными заболеваниями легких. Среди них 43 больных страдали хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), диагноз которой основывался на критериях GOLD-2006 [2]. У 5 больных выявлена бронхоэктатическая болезнь (БЭБ), подтвержденная бронхологическим исследованием.

Исследование уровня ААТ в сыворотке крови проводили по методике турбидиметрии, основанной на измерении изменения интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Для исследования брали 5 мл венозной крови натощак, выделяли сыворотку методом центрифугирования. Далее на спектрофотометре (Beckman) проводили турбидиметрический анализ с использованием набора фирмы SPINREACT (Испания). Набор состоит из тройного буфера (растворитель, R1), раствора антител к человеческому альфа-1-антитрипсину (R2) и калибратора. Предварительно строили калибровочную кривую с помощью разведения готового калибратора альфа-1-антитрипсина в растворителе (0,9% р-р NaCl) в различных концентрациях и расчета концентрации с помощью фактора разведения. Условия проведения исследования: реактивы в термостате доводили до температуры  $37^\circ\text{C}$ , рабочая длина волны – 340 нм, длина оптического пути – 1 см. После настройки фотометра в кювету добавляли растворитель (R1) и исследуемую сыворотку, затем считывали значение оптической плотности этого раствора (A1). После этого в кювету добавляли реактив (R2) и считывали значение оптической плотности (A2). Концентрацию ААТ рассчитывали методом интерполяции разницы величин оптической плотности (A1-A2) на калибровочную кривую.

Для определения фенотипа ААТ капли цельной крови наносили на специальную фильтровальную бумагу, высушивали, отправляли в лабораторию по исследованию ААТ в Университетской клинике Марбурга (Германия). При генетическом исследовании использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В основе метода ПЦР лежит комплементарное дстраивание ДНК-матрицы, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента ДНК-полимеразы. Отобранный материал, обработанный в центрифуге (15  $\mu\text{л}$  образца), переносят в микроцентрифужную пробирку. В нее добав-

ляют амплификационную смесь и помещают в программируемый термостат. Каждый цикл амплификации включает 3 этапа: денатурация, присоединение праймеров (отжиг) и дстраивание цепей ДНК. Весь процесс амплификации занимает 20 мин. 15  $\mu\text{л}$  готового материала подвергают электрофорезу с помощью 1,4%-го агарозного геля. В зависимости от электрофоретической подвижности аллелей обозначаются буквенным кодом от А до Z. Наиболее близко приближающийся к аноду протеин обозначается буквой М, наименее медленно двигающийся аллель – буквой Z.

В качестве контрольной группы обследованы 11 здоровых лиц (в том числе – мужчин 4), средний возраст которых составил  $24,45 \pm 1,85$  лет.

Полученные данные обработаны статистическими методами с расчетом средних величин и критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Исследование уровня ААТ у пациентов ХОБЛ обнаружило колебания от 24 до 308 мг/дл, средний уровень составил  $148,0 \pm 69,5$  мг/дл (табл. 1). Уровень ААТ у здоровых лиц варьировал от 147 до 272 мг/дл или в среднем  $236,0 \pm 36,8$  мг/дл, что было достоверно выше, чем у больных ХОБЛ ( $p < 0,001$ ). Здесь следует отметить, что нормальное содержание ААТ в сыворотке крови представлено достаточно широким разбросом величин [3, 11–13]. По “Стандартам диагностики и ведения дефицита альфа-1-антитрипсина”, нормальная концентрация ААТ в крови соответствует 150–350 мг/дл [3]. ААТ является острофазовым показателем воспаления, может значительно повышаться во время обострений хронических заболеваний, у курящих лиц и т.д. Более того, различные источники указывают на различный пороговый уровень ААТ [3, 11, 14, 15].

Мы руководствовались рекомендациями производителя реагентов ААТ, согласно которым нормальное содержание ААТ может варьировать от 90 до 270 мг/дл. Снижение сывороточного уровня ААТ менее 90 мг/дл является признаком дефицита ААТ. Среди наших больных оказалось 7 (или 17%) пациентов с дефицитом, у которых уровень ААТ варьировал от 24,0 до 89,0 мг/дл (в среднем  $66,7 \pm 25,6$  мг/дл), достоверно отличаясь от остальных пациентов с ХОБЛ (табл. 1). В целом это очень высокий показатель, так как, по литературным данным, в общей популяции белой расы распространенность тяжелого дефицита альфа-1-антитрипсина, соответствующего фенотипу PiZZ, составляет менее 1% [3, 6, 7]. Высокий показатель, выявленный нами, может

объясняться тем, что исследуемую группу составили пациенты с хроническими заболеваниями легких, что значительно повышает вероятность наличия дефицита ААТ в данной популяции. Среди пациентов с ХОЗЛ различной степени тяжести этот показатель варьирует от 1 до 17,8% [3, 16, 17].

Известно, что уровень ААТ определяется его фенотипом (табл. 2), обозначаемым символом Pi (от англ. proteinase inhibitor). Нормальное содержание ААТ в сыворотке крови связано с аллелью, обозначенной буквой M (PiM). Вариант PiMM в общей популяции белой расы встречается с частотой 95%, вариант PiMS – 3–11%, PiSS – 0,01–2%, PiMZ – 2–5%, PiZZ – 0,02–0,06% [3].

Результаты генетического анализа выявили, что носителями MM аллелей являются 39 пациентов, один пациент (2,4%) имел фенотип ZZ и еще один (2,4%) – фенотип MZ. При этом у пациента с фенотипом ZZ уровень ААТ был самым низким – 24 мг/дл, с фенотипом MZ – 42 мг/дл. У остальных 5 пациентов с уровнем ААТ <90 мг/дл был выявлен фенотип MM.

По данным ряда эпидемиологических исследований, частота фенотипа ZZ в группах с ХОЗЛ варьирует от 1 до 4,5% [16, 17]. В нашем исследовании при имеющемся небольшом объеме выборки рано делать выводы о распространенности фенотипа ZZ в кыргызской

популяции, но можно заявить о его наличии и предположить роль его вклада в развитие хронических обструктивных заболеваний легких. Примечательно, что при данном небольшом объеме выборки уже обнаружены случаи тяжелого дефицита ААТ, в то время как в ряде работ, проведенных в странах Азии, дефицитного фенотипа не обнаружено вовсе [18–22].

Полученные нами данные имеют важное практическое значение для Кыргызстана, так как объясняют одну из возможных причин высокой смертности от болезней органов дыхания. Однако, они представляют теоретическую новизну, подтверждая глобальную распространенность дефицита ААТ в различных популяциях. Представляется важным проведение дальнейших исследований дефицита ААТ в кыргызской популяции, что позволит уточнить вклад этого генетического фактора в развитие и прогрессирование ХОБЛ в условиях Кыргызстана, а также уточнить закономерности распространения вариантов фенотипа ААТ в различных азиатских популяциях.

#### Выводы

Уровень ААТ у пациентов с ХОЗЛ в кыргызской популяции достоверно более низкий по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

Среди пациентов-кыргызов с ХОЗЛ выявлены фенотипы Pi ZZ и MZ, что подтверждает

Таблица 1

Уровень сывороточного  $\alpha$ -1-антитрипсина в различных группах кыргызской популяции ( $M \pm \sigma$ )

Показатель	Пациенты			Группа здоровых лиц (n=11)
	с ХОБЛ (n=41)	без дефицита (n=34)	с дефицитом (n=7)	
Сывороточный ААТ, мг/дл	148,0 ± 69,5	168,4 ± 61,6	66,7 ± 21,1	236,0 ± 36,8

Таблица 2

Уровень ААТ сыворотки крови при различных фенотипах ААТ [3]

Pi фенотип	Уровень ААТ в сыворотке крови		% от нормального уровня сывороточного ААТ
	$\mu$ M	мг/дл (мг/дл × 0,1923 = $\mu$ M)	
MM	20-48	150-350	100
MZ	17-33	90-210	57
SS	15-33	100-200	60
SZ	8-16	75-120	37
ZZ	2.5-7	20-45	15
Z0	<2.5	<20	8
00	0	0	0

гипотезу глобальной распространенности дефицита ААТ.

Авторы выражают благодарность профессору Claus Vogelmeier, руководителю центра ААТ-Labor по исследованию ААТ при клинике университета Марбурга (Марбург, Германия) за содействие в выполнении генетического фенотипирования.

#### Литература

1. *Laurell C.B.* The electrophoretic  $\alpha$ 1-globulin pattern of serum in  $\alpha$  1-antitrypsin deficiency/ *Laurell C.B., Ericksson S.* // *Scand. J.clin. Lab. Invest.* – 1963. – V. 15. – P. 132.
2. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD // Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).* – 2006.
3. *American Thoracic Society / European Respiratory Society Statement: Standards for the Diagnosis and Management of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency // Am J Resp Care Crit Care Med.* – 2003. – Vol. 168. – № 7. – P. 825.
4. *Crystal R.G.* Alpha1-antitrypsin deficiency: pathogenesis and treatment / *R.G. Crystal // Hosp. Pract.* – 1991. – P. 81–94.
5. *Stockley R.A.* Neutrophiles and protease/antiprotease imbalance/ *R. A. Stockley // Am J Resp Crit Care Med.* – 1999. – V. 160. – P. 49–52.
6. *Silverman E.K.* Alpha1-antitrypsin deficiency: high prevalence in the St. Luis area determined by direct population screening / *E.K. Silverman, S.P. Miletich, J.H. Pierce, L.A. Sherman, S.K. Endicott, G.J. Broze, E.S. Campbell // Am Rev Respir Dis.* – 1989. – V. 140. – P. 961–966.
7. *Dykes D.* Distribution of alpha1-antitrypsin in a US white population / *D. Dykes, S. Miller, H. Polesky // Hum Hered.* – 1984. – V. 34. – P. 308–310.
8. *de Serres F.J.* Estimated numbers and prevalence of PI\*S and PI\*Z deficiency alleles of alpha-1-antitrypsin deficiency in Asia / *de Serres F.J., I. Blanco and E. Fernández-Bustillo // Eur Respir.* – 2006. – V. 28. – P. 1091–1099.
9. *de Serres F.* Worldwide racial and ethnic distribution of alpha 1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys/de Serres F. // *Chest* 2002. – V. 122. – P. 1–12.
10. *European White Lung Book. European Respiratory Journal, Ltd.* – 2003. – P. 36.
11. *Brantly M.* Use of a highly purified  $\alpha$ -1 antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficiency phenotypes / *M. Brantly, J.T. Wittes, C.F. Vogelmeier, R.C. Hubbard, G.A. Fells, R.G. Crystal // Chest.* – 1991. – 100. – P. 703–708.
12. *Brantly M.* Laboratory diagnosis of  $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency. /In: *Crystal RG, editor / Brantly M. // Alpha 1-antitrypsin deficiency.* – New York: Marcel Dekker. – 1996. – P. 211–226.
13. *Brantly M.* Molecular basis of  $\alpha$ -1 antitrypsin deficiency / *M. Brantly, T. Nukiwa, R.G. Crystal // Am J Med.* – 1988. – 84(Suppl 6A). – P. 13–31.
14. *Banasik J.* Diagnosing alpha 1-antitrypsin deficiency / *J. Banasik // Nurse Pract.* – 2001. – V. 26. – №1. – P. 60–65.
15. *Crystal R.G.* Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease: genetic basis and strategies for therapy / *R.G. Crystal // J Clin Invest.* – 1998. – V. 85. – P. 1343–1352.
16. *Cox D.W.* Protease inhibitors in patients with chronic obstructive respiratory disease: the  $\alpha$ 1-antitrypsin heterozygote controversy / *D.W. Cox, V.H. Hoepfner, H. Levison // Am Rev Respir Dis.* – 1976. – V. 113. – P. 601–606.
17. *Lieberman J.*  $\alpha$ 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients / *J. Lieberman, B. Winter, A. Sastre // Chest.* – 1986. – V. 89. – P. 370–373.
18. *Kim C.H.* Alpha-antitrypsin genotypes in Korean patients with chronic obstructive pulmonary disease / *C.H. Kim, J.J. Yim, C.G. Yoo, C.T. Lee, Y.W. Kim, S.K. Han, Y.S. Shim // Respirology.* – 2005. – Mar; 10(2). – P. 223–228.
19. *Zhang Y.* The investigation of genotype and expression of alpha1-AT in patients with COPD / *Y. Zhang, B. He, M.W. Zhao, X.H. Wang, L. Jiang, W.Z. Yao // Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – May 2005. – V. 18; 85(18). – P. 1270–1273.
20. *Kwok J.S.* Protease inhibitor phenotypes and serum alpha-1-antitrypsin levels in patients with COPD: a study from Hong-Kong / *J.S. Kwok, J.W. Lawton, W.W. Yew, C.H. Chau, J. Lee, P.C. Wong // Respirology.* – 2004. – Jun. – V. 9. – № 2. – P. 265–270.
21. *Lee S.S.* Alpha-1-antitrypsin phenotypes by isoelectric focusing in a metropolitan southern Chinese population / *S.S. Lee, J.W. Lawton, K.H. Ko, K.M. Lam, C.K. Lin // J Clin Pathol.* – 2001. – Oct. – V. 54, 10. – P. 798–800.
22. *Saha N.* Alpha 1-protease inhibitor (PI) subtypes in seven populations of east Asia / *N. Saha // Ann Hum Biol.* – 1990. – May-Jun. – V. 17. – № 3. – P. 229–234.