



КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ДЕФИЦИТА АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА У БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ И БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА — КОНОВАЛОВА

Шапошникова Н. А., Шулятьев И. С., Варванина Г. Г., Дроздов В. Н.

ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москвы

Шапошникова Наталья Александровна

Москва, шоссе Энтузиастов, д. 86

Тел.: 8 (495) 304 3025

E-mail: natalka1212@rambler.ru

Альфа-1-антитрипсин (A1A), естественный ингибитор протеаз в плазме крови, впервые был открыт в 1963 году. A1A играет важную роль в активации нейтрофильной эластазы и других протеаз, обеспечивая баланс протеаз/антипротеаз. Он связывает такие протеазы, как эластаза, трипсин, хемотрипсин, тромбин, бактериальные протеазы. Самый важный физиологический эффект — это ингибирование лейкоцитарной эластазы [8].

Альфа-1-антитрипсин (A1A) повышается в острую фазу воспаления, следовательно, его концентрация может повышаться при гепатитах (острых и /или хронических), циррозах печени, панкреатитах и т. д. Уровень альфа-1-антитрипсина может снижаться первично — при наследственном дефиците, а также вторично — при потере общего белка организмом (нефротический синдром, тяжелая печеночно-клеточная недостаточность. Также местное снижение уровня альфа-1-антитрипсина в легких встречается у курильщиков и описано у больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Человеческий A1A — белок массой 52 кДа, гликопротеид, состоящий из 394 аминокислот. Ген, кодирующий альфа-1-антитрипсин, расположен на 14-й хромосоме (14q32.1) и состоит из 5 экзонов.

В результате дефицита A1A развивается вариабельное заболевание, которое, как правило, манифестирует сразу после рождения ребенка и проявляется увеличением печени, развитием желтухи, обесцвечиванием кала, потемнением мочи вследствие холестаза. Лабораторные исследования указывают на наличие гипербилирубинемии конъюгированного типа, гиперхолестеринемии, увеличение щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы [2], умеренный подъем активности трансаминаз крови.

Такая картина обычно наблюдается до 10-й недели жизни, далее эти дети или погибают, или клинические проявления спонтанно исчезают в конце первого полугодия. В дальнейшем у этих больных нередко диагностируется хронический гепатит [6], могут развиваться цирроз печени с типичными его проявлениями (гепатоспленомегалия, портальная гипертензия и др. [3]) или часто рецидивирующие желтухи с зудом и выраженной гиперхолестеринемией.

Примерно у 10% детей, гомозиготных по аллелю Z, отмечается тяжелое поражение печени, включая гепатит у новорожденных и прогрессирующий цирроз печени. Полагают, что 15–20% хронических гепатитов у грудных детей обусловлены недостаточностью A1A. При легочной форме чаще всего имеет место картина прогрессирующей эмфиземы, однако могут наблюдаться рецидивирующий обструктивный синдром, рецидивирующий бронхит, повторные пневмонии. У взрослых гомозиготных больных с недостаточностью A1A часто развивается эмфизема легких. У взрослых недостаточность A1A чаще всего приводит к мелкоузловому циррозу печени, который со временем может перейти в крупноузловой цирроз печени, протекает бессимптомно и иногда приводит к развитию печеночноклеточного рака. Концентрация альвеолярного A1A существенно снижена не только у гомозигот, но и у гетерозигот, что существенно ухудшает прогноз и повышает летальность у данной группы больных [1]. Особенно ухудшает прогноз заболевания сочетание наследственного дефицита A1A с другими наследственными или приобретенными поражениями печени, такими как наследственный гемохроматоз [4], вирусный гепатит В и С [5], хронический алкоголизм.

Некоторые ученые фиксируют увеличение риска гепатоцеллюлярной карциномы у больных с PiZ-мутацией [12].

В настоящее время известно более 100 аллей мутации A1A. Ген имеет четыре кодирующих экзона — 2, 3, 4, 5 и три некодирующих — 1a, 1b, 1c. Аллели A1A делят на четыре класса: I — нормальный, II — дефицитный, III — нулевой и IV — с нарушением функции. Типичная нормальная аллель — PiM. А наиболее значимые дефицитные аллели — PiZ, PiP, PiS. Наиболее низкое снижение уровня A1A в сыворотке крови выявляется при PiZ-мутации. У гомозигот (PiZZ) активность составляет 12–15% от нормальных значений, у гетерозигот (PiZM) — 64% от нормальных значений. У гетерозигот PiSM активность альфа-1-антитрипсина составляет 86% от нормы.

Ген A1A экспрессируется в печеночном гепатоците. Оттуда белок через комплекс Гольджи выводится из клетки. Z-мутация приводит к накоплению синтезированного альфа-1-антитрипсина в гепатоците при очень низкой его секреции в плазму. Следствием S-мутации, как правило, является ранняя дегенерация. В мировой популяции распространенность гетерозиготного носительства PiZ- и PiS-мутаций различна и в зависимости от региона составляет 2–4% [9; 11].

Дефицит A1A обычно диагностируют при снижении его уровня в сыворотке крови ниже 90–180 мг/дл. При морфологическом исследовании с помощью иммуногистохимических методов выявляются глобулярные включения в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов. Данные включения выявляются у всех носителей патологического гена даже без клинической картины гепатита или цирроза печени. В настоящий момент доступно исследование генотипа у данной группы больных, целесообразно определять PiZ-, PiS-мутации методом SNP ПЦР [7].

Заместительной терапии в настоящее время не разработано, препаратом, который может улучшить состояние печени у больных с поражением печени, имеющим A1A-недостаточность, является урсодезоксихолевая кислота (УДХК). Однако при выраженном холестазе УДХК не способна разрешить ситуацию, так как этот препарат не является патогенетическим и у данной группы больных (уровень ГГТП более 30 норм) все равно формируется цирроз печени, требующий трансплантации [10].

Цель исследования — изучить клиническое значение снижения уровня альфа-1-антитрипсина

Таблица 1

КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ		
Показатели	Больные с болезнью Вильсона — Коновалова, 1-я группа (n = 22)	Больные с хроническими заболеваниями печени, 2-я группа (n = 39)
Средний возраст, лет, M (σ)	34,5 (15,2)	48,8 (12,2)
Пол м/ж	18 (82%)/4 (18%)	29 (66%)/10 (34%)
Алкогольный цирроз		32 (81%)
Цирроз вирусной этиологии	—	4 (10%)
ПБЦ	—	1 (3%)
ПСХ		1 (3%)
Стеатогепатит	—	1 (3%)
Класс цирроза по Чайлд-Пью:		
А	18 (82%)	24 (62%)
В	2 (9%)	8 (20%)
С	2 (9%)	6 (15%)
Варикозно расширенные вены пищевода:		
0	10 (46%)	18 (46%)
1	8 (36%)	12 (31%)
2	4 (18%)	6 (15%)
3	—	3 (8%)
Асцит:		
есть	—	7 (19%)
нет	22 (100%)	32 (81%)

Примечание: Концентрация A1A у больных с хроническими заболеваниями печени. Фактор дисперсии 14,7 при $p < 0,001$

у больных с хроническими заболеваниями печени, а также определить прогностическое значения уровня A1A у больных гепатолентикулярной дегенерацией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень A1A был изучен в двух группах больных: первая группа включала 22 больных с болезнью Вильсона — Коновалова (БВК) и вторая группа — 39 больных с поражением печени различной этиологии, преимущественно алиментарной 32 (84%), клинико-демографическая характеристика больных представлена в *табл. 1*.

Больным проводилось стандартное лабораторное обследование, включавшее общий анализ крови, биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТП, альбумин, билирубин), протромбиновый индекс (ПТИ). У больных с болезнью Вильсона — Коновалова дополнительно определялся уровень церрулоплазмينا в сыворотке крови, исследовались уровень общей и прямой меди, суточная экскреция меди с мочой. Всем больным был определен уровень A1A в крови, (*α 1-Antitripsin ELISA Kit. Immunodiagnostik AG*) и изучены мутации в гене A1A, определялся полиморфизм по аллелям PiMM, PiMS, PiSS, PiMZ, PiZZ методом аллельспецифичной ПЦР.

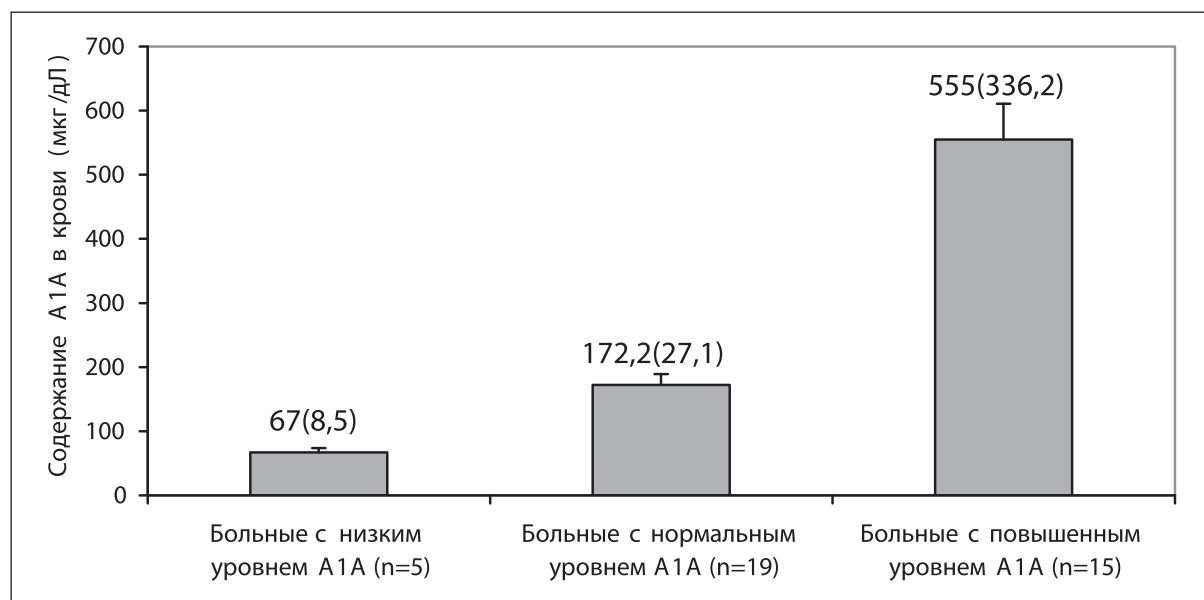
Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи пакета программ *Statistika 6,0* и *Biostat*, рассчитывались средние значения (M) и стандартное отклонение средней (σ) для количественных признаков и доли (p) и стандартная ошибка доли (S_p) для качественных признаков. Также для количественных и качественных признаков рассчитывался 95%-ный доверительный интервал. Достоверность разницы полученных значений принимали как $p \leq 0,05$. Для оценки разности количественных значений использовали критерий

Стьюдента и его модификации: парный критерий Стьюдента для изучения динамики исследования в одной группе, критерий Ньюмена — Кейлса для оценки разницы значений при множественных сравнениях. Для оценки разницы непараметрических критериев применяли критерий Манна — Уитни для сравнения групп и критерий Уилкоксона, для оценки динамики в одной группе, критерий Крускала — Уоллиса при множественных сравнениях. Для анализа разницы качественных признаков рассчитывали достоверность разницы долей (z) или использовали критерии сопряженности — критерий χ^2 или критерий Фишера. Для статистического установления зависимостей проводили корреляционные исследования по Пирсону для количественных критериев и по Спирмену — для качественных критериев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам генетического исследования в обследованной группе больных был обнаружен 1 больной с полиморфизмом гена A1A по типу PiMS, у остальных отмечался PiMM-тип. Больной генотипом PiMS — мужчина 29 лет, ранее наблюдался с диагнозом стеатогепатит. Из сопутствующих заболеваний в анамнезе — бронхиальная астма. У данного больного отмечался самый низкий уровень A1A — 50 мг/дл. Течение заболевания характеризовалось гепатомегалией (увеличением печени), цитолитическим синдромом (АСТ, АЛТ более 5 норм) и повышением уровня ГГТ до 4 норм. Больному назначена терапия препаратами УДХК, и он взят под наблюдение.

При анализе полученных результатов больные с БВК были выделены в отдельную группу, так как применяемый для лечения основного



Концентрация A1A у больных с хроническими заболеваниями печени. Фактор дисперсии 14,7 при $p < 0,001$

заболевания Д-пеницилламин непосредственно влияет на синтез А1А и его положительный эффект ряд исследователей связывают со снижением уровня А1А, ингибирующего нейтрофильную эластазу и протеазы. Все больные БВК, включенные в исследование, получали Д-пеницилламин в дозе от 750 до 1000 мг в сутки. У 6 (26%) больных отмечалось снижение уровня А1А 57 (56,7–60) мг/дл, у 8 (36%) больных колебался в пределах нормы 173,5 (95–195) мг/дл и у 8 (36%) больных был повышен — 278 (222–560) мг/дл, критерий Крускала — Уоллиса $p < 0,001$. Показатели функционального состояния печени уровень альбумина, билирубина, ПТИ, АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТП достоверно не отличались независимо от уровня А1А.

Отмечалось изменение показателей обмена меди в зависимости от содержания А1А в крови. У больных с низким содержанием А1А составлял $23,9 \pm 9,3$ мкг/дл, при нормальном содержании — $17,9 \pm 1,6$ мкг/дл, при повышенном значении А1А — $32,95 \pm 9,0$ мкг/дл, достоверность разницы по критерию Крускала — Уоллиса $p < 0,001$. Уровень церулоплазмينا в этих подгруппах достоверно не отличался и составил $13,8 \pm 3,5$; $9,65 \pm 7,64$ и $14,8 \pm 38,6$ мг/дл соответственно. Прямая фракция меди у больных с низкими значениями альфа-1-антитрипсина не обнаруживалась ни у одного больного, у больных с нормальным содержанием А1А прямая фракция меди отмечалась у 4 (50%) больных, от 2 до 4 мкг/дл, и у 5 (63%) больных с высокими значениями А1А прямая фракция меди составляла от 2 до 7 мкг/дл, $\chi^2 = 6,01$; $p = 0,05$.

Таким образом, снижение уровня А1А было связано со снижением фракции прямой меди и увеличением выведения меди из организма больного.

В группе больных с хроническими заболеваниями печени уровень А1А колебался от 67,5 до 1875 мг/дл. Снижение уровня А1А отмечалось у 5 (13%) больных, нормальный уровень А1А отмечался у 19 (49%) больных, у 15 (38%) отмечалось повышение уровня А1А (см. рис.). Учитывая биологическое значение А1А, можно было предполагать, что его повышение является ответной реакцией

на воспалительную активность и препятствует повреждению печени цитолитического или холестатического характера. Вместе с тем развивающаяся при циррозе печени белково-синтетическая недостаточность может приводить к дефициту синтеза А1А и тем самым усугублять цитолитический и холестатический синдромы. Была установлена отрицательная корреляция между уровнем А1А и биохимическими показателями цитолитического и холестатического синдрома: А1А vs АСТ — $r = -0,4$, $p = 0,01$; А1А vs АЛТ — $r = -0,32$, $p = 0,047$; А1А vs ГГТП — $r = -0,35$, $p = 0,028$; А1А vs ЩФ — $r = -0,38$, $p = 0,017$. Достоверность корреляционных взаимоотношений подтверждалась и достоверной разницей в активности ферментов, характеризующих цитолитический и холестатический синдром (табл. 2).

Цитолитический синдром в группе больных с повышенным А1А был менее выражен. Активность АЛТ (Е/л) в данной подгруппе была достоверно ниже ($F = 3,26$, $p = 0,05$). Достоверно выше в крови больных с нормальным и низким содержанием А1А были маркеры холестаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение уровня альфа-1-антитрипсина и изучение генетического полиморфизма позволяет выделить из группы больных хроническими заболеваниями печени генетические формы поражения печени, обусловленные наследственным дефицитом альфа-1 антитрипсина.

Определение уровня альфа-1-антитрипсина у больных с болезнью Вильсона — Коновалова является дополнительным критерием оценки эффективности терапии Д-пеницилламином.

Снижение уровня альфа-1-антитрипсина у больных с циррозом печени является неблагоприятным прогностическим критерием, так как способствует усилению холестатического и цитолитического синдрома.

Таблица 2

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОЛИТИЧЕСКОГО И ХОЛЕСТАТИЧЕСКОГО СИНДРОМОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА В КРОВИ			
Показатели	Больные со сниженным уровнем А1А (n = 5)	Больные с нормальным уровнем А1А (n = 19)	Больные с повышенным уровнем А1А (n = 15)
Альфа-1-антитрипсин (мкг/дл)	67 (8,5)	172 (27,1)	555 (336,2) *
АЛТ (МЕ/л)	51,7 (31,3)	97,9 (66,5)	102,2 (70,1) *
АСТ (МЕ/л)	102,2 (70,1)	88,1 (97,9)	51,8 (31,3)
ЩФ (МЕ/л)	131,4 (46,7)	147,5 (48,1)	108,8 (36,5) *
ГГТП (МЕ/л)	304 (137,6)	278 (136)	175,9 (112,5) *

Примечание: * — $p < 0,05$ по критерию Крускала — Уоллиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tanash H. A., Nilsson P. M., Nilsson J. A. *et al.* Survival in severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ) // *Respir. Res.* — 2010. — Vol. 11. — P. 44. PMID: 20420704.
2. Holme J., Dawkins P. A., Stockley E. K. *et al.* Studies of gamma-glutamyl transferase in alpha-1 antitrypsin deficiency // *COPD.* — 2010. — Vol. 7, № 2. — P. 126–132. PMID: 20397813.
3. Voide N., Ardigo S., Morris M. *et al.* Alpha-1-antitrypsin deficiency in a 78-year-old woman with isolated liver cirrhosis // *J. Am. Geriatr. Soc.* — 2010. — Vol. 58, № 2. — P. 415–416. PMID: 20370885.
4. Lam M., Torbenson M., Yeh M. M. *et al.* HFE mutations in alpha-1-antitrypsin deficiency: an examination of cirrhotic explants // *Mod. Pathol.* — 2010. — Vol. 23, № 5. — P. 637–643. Epub 2010 Mar 5. PMID: 20208481.
5. Nair V., Fischer S. E., Adeyi O. A. Non-viral-related pathologic findings in liver needle biopsy specimens from patients with chronic viral hepatitis // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2010. — Vol. 133, № 1. — P. 127–132. PMID: 20023268.
6. Topic A., Alempijevic T., Milutinovic A. S. *et al.* Alpha-1-antitrypsin phenotypes in adult liver disease patients // *Ups. J. Med. Sci.* — 2009. — Vol. 114, № 4. — P. 228–234. PMID: 19961268.
7. Marchetti A. L., Highsmith E. d W., Tsongalis G. J. *et al.* Real time PCR detection of the PI*Z and PI*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency // *Am. J. Transl. Res.* — 2009. — Vol. 1, № 4. — P. 406–411. PMID: 19956452.
8. Gooptu B., Ekeowa U. I., Lomas D. A. Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights // *Eur. Respir. J.* — 2009. — Vol. 34, № 2. — P. 475–488. Review. PMID: 19648523.
9. Spínola C., Bruges-Armas J., Pereira C. *et al.* Alpha-1-antitrypsin deficiency in Madeira (Portugal): the highest prevalence in the world // *Respir. Med.* — 2009. — Vol. 103, № 10. — P. 1498–1502. Epub 2009 May 17. PMID: 19450958.
10. Lykavieris P., Ducot B., Lachaux A. *et al.* Liver disease associated with ZZ alpha1-antitrypsin deficiency and ursodeoxycholic acid therapy in children // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2008. — Vol. 47, № 5. — P. 623–629. PMID: 18955864.
11. de Serres F. J., Blanco I., Fernández-Bustillo E. PI S and PI Z alpha-1 antitrypsin deficiency worldwide. A review of existing genetic epidemiological data // *Monaldi Arch. Chest. Dis.* — 2007. — Vol. 67, № 4. — P. 184–208. Review. PMID: 18309698.
12. Zhou H., Ortis-Pallardo M. E., Ko Y. *et al.* Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PiZ a risk factor for primary liver carcinoma? // *Cancer.* — 2000. — Vol. 88. — P. 2668–2676.