



О РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ В КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Сыдыкова С.Ж., Алымбаева М.Ж., Бримкулов Н.Н.

Кыргызско-Российский Славянский университет.

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, г. Бишкек, Кыргызстан

Резюме. Для оценки генетических факторов предрасположенности к ХОБЛ изучены уровень и фенотипы альфа-1-антитрипсина (ААТ) у 109 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких кыргызской популяции. Сывороточный дефицит альфа-1-антитрипсина среди обследованных лиц обнаружен у 10 человек (9,2%), составив в среднем $68,0 \pm 21,2$ мг/дл. Среди пациентов этой группы один пациент имел фенотип PiZZ, а трое - PiMZ.

Ключевые слова: дефицит альфа-1-антитрипсина, ААТ, хроническая обструктивная болезнь легких, генетический фактор, фенотип, кыргызская популяция

ABOUT THE ROLE OF THE GENETIC FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF THE CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN KYRGYZ POPULATION

Summary. Levels and phenotypes of alpha-1-antitrypsin in 109 Kyrgyz patients with chronic obstructive lung disease are studied with the purpose of assessment of the role of the genetic susceptibility to COPD. Among the investigated patients, serum AAT deficiency is found in 10 patients (9,2%), with $68,0 \pm 21,2$ mg/dl at the average. Among the deficiency patients, one patient has PiZZ, 3 - PiMZ phenotype.

Key words: alpha-1-antitrypsin deficiency, AAT, chronic obstructive lung diseases, genetic factor, phenotype, Kyrgyz population.

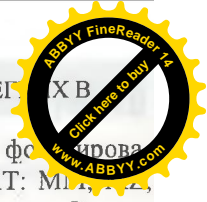
Актуальность. Болезни органов дыхания являются одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения во всем мире, и занимают лидирующее положение среди причин смертности в большинстве стран мира [6]. На сегодняшний день ХОБЛ является четвертой причиной смертности в мире, причем к 2030 году она станет третьей причиной общей смертности в мире [6]. Высокие показатели смертности, объясняются комплексом факторов, как социально-экономических, так и этиопатогенетических [5]. Несмотря на то, что курение является самым существенным фактором риска, лишь у 10-20% курильщиков развивается ХОБЛ. Таким образом, становится понятно, что в развитии ХОБЛ играют роль и другие факторы, в том числе генетические. Предполагается, что в развитии ХОБЛ играют роль множество генов, и генетическая предрасположенность определяется различными генетическими комбинациями [7]. Дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ) является этиопатогенетическим фактором развития ХОБЛ с доказанной генетической обусловленностью фермента [1, 5]. Подавляя избыточную активность протеолитических ферментов, в особенности нейтрофильной эластазы, ААТ защищает ткани организма, в первую очередь – легких, от протеолиза [11]. В европейских странах частота дефицита ААТ среди белой популяции достигает 0,02-0,06% [1, 3]. Исследований ААТ в азиатских популяциях проведено значительно меньше [3]. Более того, до недавнего времени считалось, что дефицит ААТ является уделом белой популяции и не наблюдается в азиат-

ских странах. Однако de Serres, выполнив анализ опубликованных работ по распространенности дефицита ААТ, заявляет о глобальной распространенности генетического дефицита ААТ [3].

Кыргызстан отличается от других стран Европейского региона самыми высокими показателями смертности от хронических болезней органов дыхания [4]. Тем не менее, роли генетического фактора в наблюдаемом «лидерстве» Кыргызстана по этим нозологиям до сих пор уделялось недостаточно внимания. Поэтому для Кыргызстана изучение проблемы дефицита ААТ имеет особое значение. Отсутствие разработок в данном направлении стало обоснованием для проведения данного исследования.

Целью работы явилась оценка генетических механизмов предрасположенности к ХОБЛ на основе изучения уровня и фенотипа ААТ у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в кыргызской популяции.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие пациенты стационаров г. Бишкек, пульмонологического отделения Национального Госпиталя и городской клинической больницы №6, отделения экстренной терапии городской клинической больницы №1. Пациентам разъяснялась цель и суть исследования, и при получении согласия, пациентами подписывалось письменное соглашение. Критерии отбора включали этническую принадлежность к кыргызской популяции, наличие верифицированной хронической обструктив-



О РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ КЫРГЫЗСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

той болезни легких (ХОБЛ, эмфизема) любой степени тяжести; отсутствие тяжелых сопутствующих заболеваний.

Обследованы 109 пациентов кыргызской национальности, в том числе 53 мужчины и 56 женщин (средний возраст $57,5 \pm 13,4$ лет) с хронической обструктивной болезнью легких. Контрольную группу составили 26 практически здоровых лиц, из них 18 мужчин и 8 женщин, средний возраст которых составил $30,0 \pm 6,6$ лет. Группа здоровых лиц состояла из добровольцев, информированных о сути исследования и давших письменное согласие на участие.

Определение сывороточного уровня ААТ. Исследование уровня ААТ в сыворотке крови проводилось методикой турбидиметрии на спектрофотометре (Beckman) с использованием набора фирмы SPINREACT (Испания). Набор включает в себя тройной буфер (растворитель, R1), раствор антител к человеческому альфа-1-антитрипсину (R2), и калибратор. Турбидиметрический анализ основан на измерении изменения интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Условия проведения исследования: реактивы в термостате доводились до температуры 37°C , рабочая длина волны - 340 нм, длина оптического пути 1 см. После настройки фотометра, в кювету добавляется растворитель (R1) и исследуемая сыворотка, затем считывается значение оптической плотности этого раствора (A1). Затем в кювету добавляется реактив (R2), и считывается значение оптической плотности (A2). Концентрация ААТ рассчитывается методом интерполяции разницы величин оптической плотности (A1-A2) на калибровочную кривую.

С целью внутреннего контроля качества турбидиметрического измерения уровня ААТ, все исследуемые образцы были направлены в виде высушенной капли на специальном фильтре в лабораторию г. Марбург (Германия), специализирующуюся по диагностике ДААТ.

Определение фенотипов ААТ. Для определения фенотипа ААТ капли цельной крови наносились на специальную фильтровальную бумагу, высушивались, отправлялись в лабораторию по исследованию ААТ в Университетской клинике Марбурга (Германия). Генетическое исследование включало метод полимеразной

цепной реакции (ПЦР), изоэлектрическое фенотипирование и определяло основные фенотипы ААТ: M α 1ZZ, MS, SS, и так называемый нулевой фенотип. Редкие фенотипы не определялись.

Полученные данные заносились в программу Microsoft Office Excel 2003, и были обработаны с применением пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Достоверность различий оценивалась с помощью t-теста.

Результаты и их обсуждение. Исследование уровня ААТ в нашем исследовании у пациентов ХОБЛ обнаружало колебания от 24 до 308 мг/дл, средний уровень составил $168,1 \pm 58,6$ мг/дл. Уровень ААТ у здоровых лиц варьировал от 147 до 314 мг/дл или в среднем $205,1 \pm 42,4$ мг/дл, что было достоверно выше, чем у больных ХОБЛ ($p=0,003$).

Следует отметить, что нормальное содержание ААТ в сыворотке крови представлено достаточно широким разбросом величин [1-2]. Согласно «Стандартам диагностики и ведения дефицита альфа-1-антитрипсина» нормальная концентрация ААТ в крови соответствует 150-350 мг/дл [1]. 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 [1-2]. 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. На основании этого порогового уровня, пациенты были разделены на группу с дефицитом и группу без дефицита ААТ. Группа с пограничным уровнем была условно выделена ввиду того, что гетерозиготные фенотипы (MZ, MS) могут иметь уровень ААТ в крови выше дефицитного, однако ниже среднего нормального.

Итак, группа с дефицитом была представлена 10 пациентами (9%), у которых уровень ААТ варьировал от 24,0 до 89,0 мг/дл (в среднем $68,0 \pm 16,0$ мг/дл), достоверно отличаясь от остальных пациентов с ХОБЛ ($p<0,001$) (табл. 1).

Таблица 1

Уровень сывороточного α 1-АТ в различных группах кыргызской популяции (M \pm σ)

	Все пациенты с ХОБЛ (n = 109)	Пациенты без дефицита (n=82)	Пациенты с пограничным уровнем (n=17)	Пациенты с дефицитом (n=10)	Группа здоровых лиц (n=26)
Сывороточный ААТ, мг/дл	$168,1 \pm 58,6$	$194,4 \pm 41,5$	$106,4 \pm 9,1$	$68,0 \pm 21,2$	$205,1 \pm 42,4$

В целом это очень высокий показатель, так как по данным литературы, в общей популяции белой расы распространенность тяжелого дефицита альфа-1-антитрипсина, соответствующего фенотипу PiZZ, составляет менее 1% [1]. Высокий показатель, выявленный нами, может объясняться тем, что исследуемую нами группу составили пациенты с хроническими заболеваниями легких, что значительно повышает вероятность наличия дефицита ААТ в данной популяции.

Среди пациентов с ХОБЛ различной степени тяжести этот показатель варьирует от 1 до 17,8% [1, 9].

Пациентов с пограничным содержанием ААТ в сыворотке крови, варьирующем от 90 мг/дл до 115 мг/дл (в среднем $106,4 \pm 9,09$), оказалось 17 человек, или 16%.

Неожиданным наблюдением оказался пониженный уровень ААТ у группы пациентов с ХОБЛ в целом по сравнению с уровнем ААТ у здоровых лиц. Подобных данных в литературе не найдено. Более того, уровень



АТ в группе пациентов, как острофазового неспецифического показателя воспаления, должен быть повышен в связи с тем, что в момент проведения исследования, а также забора крови, все обследованные пациенты с ХОБЛ находились в стадии обострения заболевания.

Из литературы известно, что уровень ААТ определяется его фенотипом (Табл.2), обозначаемым симво-

лом Pi (от англ. proteinase inhibitor). Нормальное содержание ААТ в сыворотке крови связано с аллелью, обозначенной буквой М (PiM). Варианта PiMM в общей популяции белой расы встречается с частотой 95%. Варианта PiMS - 3-11%, PiSS - 0,01-2%, PiMZ - 2-5%, PiZZ - 0,02-0,06% [1].

Таблица 2

Уровни ААТ сыворотки крови при различных фенотипах ААТ [1]

Pi фенотип	Уровень ААТ в сыворотке крови		% от нормального уровня сывороточного ААТ
	μM	мг/дл (мг/дл × 0,1923 = μM)	
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

Результаты генетического анализа выявили, что носителями MM аллелей являются 105 пациентов (96,3%), 1 пациент (0,9%) имел фенотип ZZ и еще 3 (2,7%) - фенотип MZ. При этом у пациента с фенотипом ZZ уровень ААТ был самым низким - 24 мг/дл, у трех пациентов с фенотипом MZ - 42, 66 и 78 мг/дл. Таким образом, фенотипы PiZZ и PiMZ были обнаружены у пациентов дефицитной группы. Все пациенты группы с пограничным и нормальным уровнем ААТ имели фенотип PiMM. Исходя из этого, можно говорить о нецелесообразности выполнения фенотипирования пациентам с нормальным уровнем ААТ.

По данным ряда эпидемиологических исследований, частота фенотипа ZZ в группах с ХОБЛ варьирует от 1 до 4,5% [9]. В нашем исследовании, при имеющемся небольшом объеме выборки, делать выводы о точной распространенности фенотипа ZZ в кыргызской популяции еще преждевременно, но можно заявить о его наличии и предположить роль его особого 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 [10]. Таким образом, наши данные подтверждают определенную генетическую детерминированность развития ХОБЛ в кыргызской популяции.

Выводы

1. Уровень ААТ у пациентов с ХОБЛ (168,1±58,6 мг/дл) в кыргызской популяции достоверно более низкий по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (205,1±42,4 мг/дл, p=0,003).

2. Среди пациентов-кыргызов с ХОБЛ (9,2%) выявлен сывороточный дефицит ААТ (68,0 ± 21,2 мг/дл).

3. Среди пациентов-кыргызов с ХОБЛ выявлены фенотипы Pi ZZ и MZ, что подтверждает гипотезу глобальной распространенности дефицита ААТ.

4. В развитии ХОБЛ у пациентов кыргызской популяции генетический дефицит ААТ играет важную роль.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. Brantly M. Laboratory diagnosis of α-1 antitrypsin deficiency. /In: Crystal RG, editor / Brantly M // Alpha 1-antitrypsin deficiency. New York: Marcel Dekker.-1996. P.211-226

3. 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.- 122.-P.1-12.

4. European White Lung Book. European Respiratory Journal, Ltd.- 2003.- P.36

5. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD// Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). - 2006.

6. <http://www.who.int/respiratory/copd>. 2008

7. Hoidal J.R. Genetics of COPD: present and future / Hoidal J.R// European Respiratory Journal. - 2001. - Nov. V.18, 5. - P. 741-743

8. Lee SS. Alpha-1-antitrypsin phenotypes by isoelectric focusing in a metropolitan southern Chinese population / Lee SS, Lawton JW, Ko KH, Lam KM, Lin CK// J Clin Pathol.-2001.- Oct; V.54,10.-P.798-800

9. Lieberman J. α1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients/Lieberman J, Winter B, Sastre A.// Chest.- 1986.- 89.-P. 370-373.

10. Saha N. Alpha 1-protease inhibitor (PI) subtypes in seven populations of east Asia / Saha N// Ann Hum Biol. - 1990.- May-Jun; V.17, № 3.-P. 229-34

11. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance/ R. A. Stockley //Am J Resp Crit Care Med.-1999.-I60.- P.49-52.