

37. Milman N, Hoffman AL, Byg KE. Sarcoidosis in children. Epidemiology in Denes: clinical features, diagnosis, treatment and prognosis. Acta Paediatr. 1998; 87: 871–878.

38. Gedalia A, Molina JF, Ellis GSJ, et al. Low-dose methotrexate therapy for childhood sarcoidosis. J. Paediatr. 1997; 130: 25–29.

39. Thumfart J, Miller D., Rudolf B, et al. Isolated sarcoid

granulomatous interstitial nephritis responding to infliximab therapy. Paediatr. Nephrol. 2006; 22: 281–285.

40. Judson MA. Extrapulmonary Sarcoidosis. Sem. Resp. and Critical Care Med. 2007; 28: 83–101.

41. Lower EE. Rare forms of sarcoidosis. In Sarcoidosis: Lung Biology in Health and Diseases. R.P. Baughman, ed. New York: Marcel Dekker, 2006; 201: 651–670.

© Коллектив авторов, 2016

Е.В. Тапыев^{1,2}, С.И. Полякова³, Н.С. Аверьянова⁴, О.И. Симонова⁵,
К.В. Савостьянов⁵, А.Ю. Асанов¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДЕФИЦИТА α_1 -АНТИТРИПСИНА В ГРУППЕ ДЕТЕЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

¹ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва; ²ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск; ³Московский НИИ неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ;

⁴ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, МО, г. Мытищи;

⁵ФГБУ «Научный центр здоровья детей» МЗ РФ, Москва, РФ

E.V. Tapyev^{1,2}, S.I. Polyakova³, N.S. Averyanova⁴, O.I. Simonova⁵,
K.V. Savostyanov⁵, A.Y. Asanov¹

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS AND CLINICAL BIOCHEMICAL POLYMORPHISM OF α_1 -ANTITRYPSIN DEFICIENCY IN GROUP OF CHILDREN WITH GASTROENTEROLOGICAL PATHOLOGY

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; ²Yakut Scientific Center of complex medical problems, Yakutsk; ³Emergency Children's Surgery and Traumatology Research Institute, Moscow, ⁴F.F. Erisman Federal Scientific Centre of Hygiene, Mytishchi; ⁵Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russia

Недостаточность α_1 -антитрипсина (A1AT) является частым, но пока еще не привлечшим внимание педиатров аутосомно-рецессивно наследуемым заболеванием, приводящим к синтезу структурно аномального A1AT и сниженной его концентрации в плазме крови. Наиболее частыми «масками» заболевания в гастроэнтерологической клинике являются криптогенный гепатит, холестаза, другие нарушения печени или высокие показатели печеночных трансаминаз. Хотя у большинства гомозиготных пациентов не развиваются клинически значимые проявления поражения печени, у части больных с недостаточностью A1AT происходит развитие таких жизнеугрожающих состояний, как цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома. Целью настоящего исследования явилась оценка частоты и клинико-лабораторных показателей недостаточности A1AT, обусловленного мутациями гена *PI*, в выборке детей с гастроэнтерологической патологией. Обобщенная оценка частоты аллеля *Z* в выборке российских детей из гастроэнтерологического отделения составила 4,25%, что может указывать на необходимость выявления мутации гена *PI*, прежде всего мутантного аллеля *PIZ* у больных детского возраста как фактора, предрасполагающего к развитию поражения печени.

Ключевые слова: недостаточность α_1 -антитрипсина, ингибитор протеиназ, гепатиты, наследственные болезни, предрасположенность, дети.

Контактная информация:

Асанов Алий Юрьевич – д.м.н., проф., зав. каф. медицинской генетики ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ
Адрес: Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецких, 8, стр. 2
Тел.: (499) 248-41-33,
E-mail: ektorat@mma.ru, asanov@mma.ru
Статья поступила 16.02.16, принята к печати 29.04.16.

Contact Information:

Asanov Aliy Yurievich – MD, Prof., Head of Medical Genetics Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Address: Russia, 119991, Moscow, Trubetskih str., 8/2
Tel.: (499) 248-41-33,
E-mail: ektorat@mma.ru, asanov@mma.ru
Received on Feb. 16, 2016, submitted for publication on Apr. 29, 2016

α_1 -antitrypsin deficiency (A1AT) is a common autosomal recessive inherited disease, but it has not yet attracted the attention of pediatricians. The disease leads to the synthesis of structurally abnormal A1AT and its reduced concentration in blood plasma. The most common «masks» of the disease in gastroenterology clinic are cryptogenic hepatitis, cholestasis, other liver disorders or high levels of hepatic transaminases. Although the majority of homozygous patients don't have clinically significant symptoms of liver damage, life-threatening conditions such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma develop in some patients with A1AT deficiency. Objective of this research – to evaluate frequency and clinical and laboratory parameters of A1AT deficiency, caused by *PI* gene mutations in group of children with gastroenterological pathology. Generalized evaluation of *Z* allele frequency in group of Russian children from the gastroenterology department was 4,25%, which may indicate the need to identify *PI* mutations, especially the mutant *PIZ* allele in young patients as a predisposing factor of liver disease development.

Keywords: α_1 -antitrypsin deficiency, proteinase inhibitor, hepatitis, hereditary diseases, predisposition, children.

Альфа-1-антитрипсин (A1AT) – это низкомолекулярный гликопротеин, который синтезируется преимущественно гепатоцитами и в меньших количествах макрофагами, клетками бронхиального, кишечного эпителия, паренхимы почек, эндотелия сосудов [1, 2].

A1AT является одним из белков большого семейства ингибиторов сериновых протеаз (SERPINA1 –SERine Protease INhibitors), одной из основных физиологических функций которого состоит в ингибировании действия разнообразных протеаз, высвобождающихся из лейкоцитов при реакциях неспецифической защиты организма [3, 4]. Некоторые изменения в структуре белка, обусловленные мутациями гена *A1AT*, способствуют межмолекулярному взаимодействию аномальных вариантов A1AT с формированием протяженных полимерных молекул [5].

Полимеры молекулы A1AT характеризуются значительно большим молекулярным весом, худшей растворимостью и в этой связи сниженной экскрецией A1AT в сыворотку крови [6]. Тем не менее полагают, что именно накопление полимеризированной формы A1AT в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов определяет развитие заболевания печени в большей степени, чем нарушение синтеза белка [7, 8].

Дефицит A1AT в сыворотке крови, вызванный его аккумуляцией в гепатоцитах, приводит к потере его ингибиторной функции и, как следствие этого, к разрушению эластина волокон альвеол легочной ткани с развитием хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и эмфиземы легких в зрелые годы. Полимеризованный A1AT рассматривают как самостоятельный фактор снижения локальной антипротеазной защиты [9], который, приобретая провоспалительные свойства, провоцирует интенсивный хемотаксис нейтрофилов и моноцитов к местам его синтеза, в частности, к клеткам эпителия кишечника, паренхимы почек, эндотелия сосудов или поврежденным участкам кожных покровов, вызывая поражение (помимо печени и легких) или способствуя возникновению таких заболеваний, как панкреатит, гломерулонефрит, паникулит, гранулематоз Вегенера, фибромиалгии и ряда других патологических состояний [10, 11].

Первичную аминокислотную последовательность A1AT и его экспрессию в сыворотку крови контролирует ген *SERPINA1* или сокращенно *PI* (proteinase inhibitor), расположенный на длинном плече хромосомы 14 (14q32.1).

Нуклеотидная структура гена представлена 5 экзонами, разделенными 4 интронными последовательностями [12].

Кодирующими первичную последовательность аминокислот в белке являются экзоны II–V. Экзон V определяет структуру активного центра молекулы A1AT. Промоторная последовательность *PI*-гена содержит специфические последовательности, регулирующие базальную экспрессию гена в условиях устойчивого равновесия в системе «протеолиз–антипротеолиз», в то время как энхансеры контролируют экспрессию во время воспалительных процессов [13].

К настоящему времени идентифицировано более 120 аллельных вариантов *PI* [14].

К дефицитарным аллелям *PI*-гена, которые являются частой причиной недостаточности A1AT, относят мутантные аллели *PiZ* (p.Glu342Lys), *PiS* (p.Glu264Val) и мутацию *G1237A* 3'-энхансерной области гена (Kalsheker-Poller), которая не затрагивает базальную экспрессию гена *PI*, но и не отвечает высокой концентрацией A1AT на острую фазу воспалительной реакции организма [15].

Наибольшее значение в клинической практике имеет дефицитарный аллель *PiZ*, обуславливающий развитие недостаточности A1AT с аутомно-рецессивным типом наследования (OMIM 613490). Известно, что 95% пациентов с A1AT недостаточностью имеют гомозиготный генотип по варианту *PiZZ* [16].

Недостаточность A1AT является распространенным заболеванием, значимость которого в структуре заболеваемости, инвалидизации и смертности населения, по мнению многих исследователей, все еще остается недооцененной [2, 17].

Наибольшая распространенность дефекта характерна для населения стран Северной, Западной и Центральной Европы и составляет в среднем от 1 на 5000 до 1 на 2000 на населения [18].

Несмотря на высокую распространенность недостаточности А1АТ, большинство патологических состояний (заболеваний) остается тем не менее не верифицированными. Оценка, проведенная по нескольким странам, в т.ч. странам Евросоюза, показала, что только 0,35% от теоретического числа больных с тяжелой недостаточностью А1АТ состоят на учете в медицинских учреждениях [19].

Незначительное число публикаций отечественных авторов, посвященных изучению частоты аллелей А1АТ в населении, были выполнены в рамках задач популяционных исследований полиморфизма сывороточных белков без использования молекулярно-генетической верификации [20]. Единичные работы посвящены оценке роли дефицита А1АТ в плазме крови на развитие хронической бронхолегочной патологии, а также сочетанию дефицита А1АТ с муковисцидозом [21], гемахроматозом [22], хроническими заболеваниями печени у взрослых и болезнью Вильсона–Коновалова [23].

Отечественные исследования, направленные на изучение клинико-лабораторных особенностей поражения печени в детском возрасте, ассоциированных с дефицитом А1АТ, практически отсутствуют. Таким образом, значение и частота дефицита А1АТ в возникновении патологии печени в детском возрасте в Российской Федерации остаются неясными.

В этой связи целью настоящего исследования явилась оценка частоты и клинико-лабораторных показателей недостаточности А1АТ, обусловленной мутациями гена *PI*, в выборке детей из гастроэнтерологического отделения крупного научно-исследовательского лечебного центра.

Материалы и методы исследования

За период с 2007 по 2011 гг. из отделения гастроэнтерологии с группой гепатологии ФГБНУ НЦЗД РАМН случайным образом были отобраны 200 больных, поступивших для диагностики и лечения основного заболевания, в т.ч. для уточнения причины заболеваний печени. Основными направляющими диагнозами были: гликогеновая болезнь, печеночная форма, IX тип; дискинезия желчных путей; цирроз печени в исходе гликогеновой болезни III типа; хронический гастродуоденит, обострение; катаральный эзофагит; билиарный цирроз, осложненный портальной гипертензией, острым холангитом; внепеченочная атрезия желчных протоков; болезнь Кароли, тяжелое течение; врожденный фиброз печени; гликогеновая болезнь IV тип; гипомоторная дискинезия желчного пузыря; аномалия развития почек: L-образная почка, атрофия зрительного нерва; цирроз печени; хронический криптогенный гепатит, минимальной степени активности; аутоиммунный гепатит; хронический гастродуоденит; хронический колит в стадии обострения; дискинезия желчных путей на фоне деформации желчного пузыря и другие состояния.

В выборку не включены больные с верифицированными заболеваниями (вирусный гепатит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, атрезии желчных путей). Средний возраст пациентов составил $11,8 \pm 4,6$ лет.

Контрольную группу составили практически здоровые (по результатам клинико-лабораторного исследования) учащиеся Кадетской школы-интерната № 69 «Второй московский кадетский корпус МЧС». В группу включены 81 человек, средний возраст которых составил $13,2 \pm 3,9$ лет, все мальчики.

Протокол обследования для всех больных включал, помимо оценок общепринятых клинико-лабораторных показателей, следующие исследования: определение общего белка сыворотки, холестерина общего, билирубина общего, прямого и непрямого, концентрации А1АТ, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспарагинаминотрансферазы (АСТ), глутамилтранспептидазы (ГГТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозы, церулоплазмينا и микроэлементов крови общепринятыми методами, используемыми в клинико-диагностической лаборатории ФГБНУ НЦЗД.

В выборке пациентов ДНК получали из венозной крови. Выделение ДНК проводили на спин-колонках с сорбентом на матрице из силикагеля (Minispinkit, General Electric Health Care, США) по протоколу производителя и использовали для проведения полимеразной цепной реакции и Real-Time PCR.

ДНК для генотипирования детей контрольной группы получали из клеток утренней порции мочи тем же методом.

Для идентификации Z-аллеля *PI* гена использованы следующие праймеры:

прямой: 5'-АТААГГСТГТГСТГАССАТСТГТС-3';

обратный: 5'-ТТГГГТГГГАТТСТАССАТТТТСТС-3'

(Morten Dahl et al, 1992).

Кроме ПДРФ, для верификации мутаций S и Z применяли Real-Time PCR на ДНК-амплификаторе CFX96 (Bio-Radlabs, США).

Последовательности праймеров и зондов:

PiS аллель

Праймеры:

прямой 5'-ААГГТГССТАТГАТГААГСГТТТ-3';

обратный 5'-ТСАГТССААСАТГГСТААГАГ-3'.

Зонды:

M аллель 5'-FAM-TGGGTGAGTTCATTTTCCAGGT-RTQ1-3';

S аллель 5'-R6G-ATATCGTGGGTGAGTTCATTTTAC-CT-BHQ2-3'.

PiZ аллель

праймеры:

прямой 5'-GCTTCCTGGGAGGTGTCCACG-3';

обратный 5'-ТТССАТГААГАГГГГАГАСТТГГ-3'.

Зонды:

M аллель 5'-FAM-CCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTC-RTQ1-3';

Z аллель 5'-R6G-CCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTTGTGTC-BHQ2-3'.

Исследование мутации *G1237A* проводили на термоциклере «Циклотемп-107» (МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва).

Частота идентифицированных генотипов, выявленных у обследованных пациентов и в контрольной группе здоровых детей

Выборка	Генотипы													
	PiMM		PiMS		PiSS		1237A		1237A/1237A		PiMZ		PiZZ	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Пациенты (200)	163	81,5	0	0	0	0	24	12	1	0,5	7	3,5	5	2,5
Здоровые дети (81)	72	90,1	0	0	0	0	8	9,9	0	0	0	0	0	0

Использованы следующие праймеры:
прямой 5'-ctaccaggaatggccttgtcc-3';
обратный 5'-ctctcagggtctgtgtcatcc-3'.

В каждой серии ПЦР применяли отрицательные и положительные контрольные образцы; результаты подтверждены прямым секвенированием, выполненным в Межинститутском центре коллективного пользования «Геном» (ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва).

Результаты и их обсуждение

Использование современных молекулярно-генетических технологий для идентификации причин дефицита А1АТ позволило описать структуру и частоты мутаций гена *PI* в группе пациентов и в контрольной группе здоровых детей.

Общие результаты молекулярно-генетического исследования пациентов представлены в табл. 1.

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что среди обследованных пациентов не выявлено аллеля *PiS* ни в гомозиготном, ни в гетерозиготном состоянии. По данным Т.А. Строковой и соавт. (2015), среди 25 детей с недостаточностью А1АТ у одного ребенка идентифицирован гетерозиготный генотип *PIMS*. Однако известно, что, помимо дефицитарных аллелей *PI*-системы, снижение концентрации белка наблюдается при ряде патологических состояний (нефротическом синдроме, некоторых формах гастроэнтеропатий, вирусном гепатите). Полученный в настоящем исследовании результат хорошо согласуется с данными о том, что данный аллель не вовлечен в патогенетические механизмы поражения печени при генетически обусловленной недостаточности А1АТ.

Помимо этого обращают на себя внимание данные о том, что среди пациентов у 24 из них диагностировано гетерозиготное носительство *Taq1 G1237A* аллеля (или 12% всей выборки) и один пациент, гомозиготный по данной мутации (0,5%). Общая оценка частоты *1237A* аллеля с учетом гомозиготного пациента составила 0,065. Ранее было высказано предположение о наличии ассоциации *Taq1 G1237A* полиморфизма в 3'-фланкирующей области гена *PI* и хронической патологии органов дыхания и раке легкого [24].

Вместе с тем данный полиморфизм не влияет ни на структуру А1АТ, ни на его базовый уровень в сыворотке крови. В этой связи полагают,

что аллель *G1237A* не ассоциирован с поражением печени.

По результатам молекулярно-генетического обследования случайной выборки пациентов гастроэнтерологического отделения у 12 детей выявлен дефицитарный аллель *PIZ* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, что составило 6% всех обследованных; в гетерозиготном состоянии аллель *PIZ* выявлен у 7 пациентов (3,5%) и у 5 больных – в гомозиготном состоянии (2,5%). Таким образом, обобщенная оценка частоты аллеля *Z* в выборке детей из гастроэнтерологического отделения составила 4,25%.

Оценка связи дефицитарной (*PiZ*) мутации *PI*-системы с результатами клинико-биохимических исследований представлена в табл. 2.

Представляет определенный интерес сопоставление направляющих диагнозов и результатов клинико-генетических исследований. Так, для группы детей с подтвержденным в настоящем исследовании наследственным дефицитом (*ZZ*) А1АТ (печеночная форма) направляющие диагнозы были: 1) хронический криптогенный гепатит, синдром холестаза; 2) полип сигмовидной кишки, распространенный катаральный колит; 3) криптогенный гепатит с минимальной степенью активности; 4) гепатит минимальной степени активности, наследственный гемохроматоз (гомозигота H63D/H63D), доклиническая стадия без перегрузки железом; 5) хронический криптогенный гепатит (нумерация пациентов соответствует порядковому номеру в табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о важности проведения молекулярно-генетической диагностики дефицита А1АТ у детей с клиническими проявлениями хронического заболевания печени, что позволяет конкретизировать основной диагноз – наследственный дефицит А1АТ.

Следует отметить менее выраженные общеклинические проявления и лабораторные показатели в группе гомозиготных пациентов настоящего исследования при сравнении с данными по пациентам с выраженным дефицитом А1АТ других авторов [10, 25–27].

Так, ни у одного ребенка в настоящем исследовании в анамнезе не отмечались явления неонатального холестаза; слабая степень иктеричности зарегистрирована у 3 пациентов, которая проявилась в возрасте от 2 до 3 месяцев жизни; показатели красной, белой крови и гемостаза

Таблица 2

Некоторые лабораторные показатели оценки активности печеночных ферментов, А1АТ и генотипы пациентов

Пациент	Возраст, годы	Пол	Рост, см	Вес, кг	Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	Общий белок, г/л	Холестерин, mmol/L	Билирубин общий, $\mu\text{mol/L}$	Билирубин прямой, $\mu\text{mol/L}$	АЛТ, IU/L	АСТ, IU/L	α_1 -антитрипсин, $\mu\text{mol/L}$	ГГТ, ед/л	Генотип
1	3	ж	91	13	10	71	3,7	10,9	1,1	152	145	17,7	57	<i>PIZZ</i>
2	8	ж	127	25	9	88	3,8	10,4	0,9	34	39	11	9	<i>PIZZ</i>
3	2	м	77	10	6	75	4,8	6,5	0,9	148	177	9,9	91	<i>PIZZ</i>
4	7	ж	118	21	8	71	3	13	1	130	123	7,7	43	<i>PIZZ</i>
5	10	м	132	30	8	65	2	9	3	136	78	7,5	36	<i>PIZZ</i>
6	3	м	97	15	6	68	4,5	25,8	1,5	86	72	20,2	–	<i>PIMZ</i>
7	17	ж	165	75	8	72	3,8	23,7	2,1	75	79	17,8	58	<i>PIMZ</i>
8	14	ж	152	48	10	73	4,2	25,2	3,9	72	62	15,6	–	<i>PIMZ</i>
9	15	м	165	42	11	67	4,6	24,7	3,8	76	77	20,1	46	<i>PIMZ</i>
10	9	ж	121	20	7	70	3,6	28,5	1,7	79	80	18,6	–	<i>PIMZ</i>
11	2	м	84	12,5	8	–	3,5	31,6	5,7	83	77	18,8	–	<i>PIMZ</i>
12	6	м	112	17	6	–	4,1	30,5	3,2	84	63	20,2	35	<i>PIMZ</i>

(протромбиновый индекс, содержание фибриногена, АЧТВ, РФМК) соответствовали нормальным половозрастным показателям; у 2 пациентов сохранялось незначительное увеличение размеров печени без спленомегалии. По данным УЗИ, диффузная неоднородность паренхимы печени выявлена у всех пациентов; у одного ребенка – расширение печеночных вен. Весьма вероятно, что относительно благоприятное течение заболевания, наблюдаемое у пациентов настоящего исследования, обусловлено эффективным лечением, в т.ч. гепатопротективной терапией, проводимой до получения результатов молекулярно-генетических исследований.

В выборке пациентов с поражением печени выявлены значимые различия в концентрации А1АТ и активности печеночных трансаминаз в сравнении с оценками, полученными в контрольной группе. Референсные значения концентрации А1АТ для исследуемой возрастной группы, принятые в клинико-диагностической лаборатории НЦЗД, составляют от 90 до 200 мг/дл (или 16,5–36,8 $\mu\text{mol/L}$).

У пациентов с мутантным аллелем *PiZ* в гомозиготном состоянии средняя концентрация А1АТ ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови составила $10,8 \pm 4,1 \mu\text{mol/L}$, у пациентов, гетерозиготных по *PiMZ*, средняя концентрация А1АТ составила $18,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/L}$ и у пациентов гастроэнтерологического отделения без дефицитарного Z-аллеля – $32,8 \pm 7,3 \mu\text{mol/L}$.

Оценки концентрации А1АТ у гомозиготных больных варьировали от 7,5 до 17,7 $\mu\text{mol/L}$ и не коррелировали ни с тяжестью основного заболевания, ни с изменчивостью оценок печеночных трансфераз (АЛТ, АСТ, ГГТ) и других биохимических показателей. Полученные данные хорошо согласуются с результатами исследования 48 больных детей, проведенных Т. Lang и соавт. [28].

Оценка значимости различий концентрации А1АТ, выполненных по непараметрическому

критерию Манна–Уитни между сравниваемыми группами, показала, что высоко значимые различия обнаруживаются между гомозиготными и гетерозиготными пациентами ($p=0,006$). Полученные данные согласуются с современными представлениями о роли дефицита А1АТ, ассоциированного с генотипом *PIZZ*, в патогенезе поражения печени.

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что значение концентрации А1АТ у некоторых гетерозиготных пациентов (генотип *PIMZ*) попадает в область нормальных значений, при этом однако верхняя граница значений находится ниже 110 мг/дл ($20,25 \mu\text{mol/L}$). Поскольку гетерозиготность по недостаточности А1АТ (*MZ*) расценивается в качестве кофактора развития хронического заболевания печени [29, 30], мы полагаем, что детям с биохимическими маркерами заболеваний печени рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования гена *PI* для подтверждения или исключения участия аллеля *PIZ* в возникновении патологии печени вне зависимости от концентрации А1АТ. Иллюстрацией приведенного заключения является данные гомозиготного (*PIZZ*) пациента № 1, у которого концентрация А1АТ превышала нижнюю границу половозрастной нормы.

При этом также следует принимать во внимание, что А1АТ является белком острой фазы воспаления. Уровень А1АТ, измеренный у пациента с патологическим аллелем гена *PI* в острой фазе воспалительного процесса, может быть воспринят как нормальный, так как размах значений уровня А1АТ даже у гомозиготных пациентов (генотип *PiZZ*) попадает в область нормальных значений. Для исключения результатов, завышенных вследствие воспалительной реакции, предлагается одновременно с А1АТ определять концентрацию С-реактивного белка как другого маркера острой фазы воспаления (изменение содержания С-реактивного белка и других бел-

ков острой фазы в крови больных вирусным гепатитом С) [31].

Известно, что только у 10–15% гомозиготных по дефициту А1АТ (*PIZZ*) больных детей развивается тяжелое поражение печени и примерно у 85% *ZZ* детей, многие из которых имели повышенные концентрации сывороточных трансаминаз в младенчестве, не имели никаких доказательств повреждения печени до 18-летнего возраста [32].

Относительно стабильное течение заболевания и медленно прогрессирующий цирроз печени и портальная гипертензия у некоторых детей создают определенные трудности в диагностике причин поражения печени.

В некоторых ранних работах, посвященных изучению влияния дефицита А1АТ на развитие патологии печени, предполагалась связь с «нулевыми» аллелями *PI*-системы, приводящими к нарушению транскрипции РНК и синтеза неполноценного белка до его секреции в сыворотку крови. На биохимическом уровне «нулевые» аллели *PI*-системы проявляются экстремально низкими уровнями белка в сыворотке либо полным отсутствием в крови. Мы полагаем, что в исследованной выборке пациенты с «нулевыми» аллелями *PI*-системы отсутствуют, и в связи с этим оценки частот «нулевых» аллелей в российских популяциях низки. Подтверждением данного предположения явилось то, что у всех пациентов с относительно низким уровнем сывороточного А1АТ (табл. 2) при молекулярно-генетическом тестировании был идентифицирован дефицитный аллель *PIZ*.

В то же время не получено статистически достоверных различий в концентрации А1АТ среди пациентов с нормальными аллелями и генотипом *PIMZ*. Тем не менее, можно предположить, что биохимическая диагностика эффективна как скрининговый метод выявления пациентов, в генотипе которых присутствуют аллели *PIZ* и «нулевые аллели». Ряд авторов рекомендует количественное определение уровня А1АТ в сыворотке крови в качестве начального исследования для диагностики дефицита А1АТ [33].

Известно, что уровень активности АЛТ и АСТ является общепринятым маркером некроза гепатоцитов вне зависимости от его этиологии и в острых случаях может превышать нормальные значения в 5–10 раз. У пациентов с генотипом *PiZZ* наблюдается статистически значимое повышение активности АЛТ и АСТ по сравнению со значениями, характерными для пациентов без *Z*-аллеля *PI*-системы в среднем в 3,6 и 3,1 раза соответственно ($p < 0,05$), так и в сравнении с пациентами, гетерозиготными по *PIMZ*, не достигающее однако значимого уровня ($p > 0,05$).

У пациентов с генотипом *PIMZ* также выявлено двукратное повышение активности печеночных ферментов, что предположительно может быть объяснено наличием вклада мутант-

ного аллеля *PIZ* в гетерозиготном состоянии в развитие патологии печени в данной группе больных. Это также может свидетельствовать в пользу необходимости выявления гетерозиготного носительства мутантного аллеля *PIZ*.

Уровень ГГТ у пациентов с генотипом *PIZZ* оказался достоверно выше, чем у пациентов без *Z*-аллеля, но не отличался от уровня гетерозиготных пациентов.

Концентрация билирубина в сыворотке крови является важным показателем, указывающим на развитие синдрома холестаза. Действительно, у детей, гомозиготных по мутантному аллелю *PIZ*, наблюдаются биохимические проявления синдрома диссеминированного холестаза, проявляющегося сочетанием нормального уровня билирубина и повышенной активностью ГГТ.

Результатами настоящего исследования показано, что гетерозиготные пациенты, т.е. дети, обладающие одним нормальным аллелем *M* и мутантным аллелем *Z*, как правило, не имеют выраженных клинических проявлений вовлечения печени и измененных биохимических показателей. Вместе с тем полученные результаты могут рассматриваться как весомый аргумент того, что гетерозиготное состояние (*MZ*) является одним из факторов генетической предрасположенности (наряду с другими пока не идентифицированными факторами внешней среды) к развитию желудочно-кишечных и печеночных расстройств у детей. Весьма важным в этой связи становится понимание общей роли недостаточности А1АТ в этиологии и патогенезе заболеваний печени. Для этого предстоит оценить частоты *PIZ* аллеля в выборке больных детей с криптогенным гепатитом и в общей выборке пациентов с заболеваниями печени неспецифической этиологии.

Поскольку в настоящее время отсутствует специфическое лечение поражения печени, обусловленное дефицитом А1АТ, оптимальным подходом предотвращения жизнеугрожающих исходов заболевания являются ранняя диагностика (в т.ч. популяционный скрининг), целенаправленные лечебно-профилактические мероприятия и медико-генетическое консультирование семей, находящихся в группе риска развития аутосомно-рецессивной формы дефицита А1АТ.

Заключение

Недостаточность А1АТ, обусловленная гомозиготностью по дефицитарному *ZZ*-аллелю, является частым, но пока еще не привлечшим внимание педиатров наследственно обусловленным заболеванием печени, требующим молекулярно-генетической диагностики и лечения.

Обобщенная оценка частоты аллеля *Z* в выборке российских детей из гастроэнтерологического отделения составила 4,25%, что может указывать на необходимость выявления мутации гена *PI*,

прежде всего мутантного аллеля *PIZ*, у больных детского возраста как фактора, предрасполагающего к развитию поражения печени.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты не противоречат литературным данным, согласно которым наличие мутантного

аллеля *PIZ* в гомозиготном состоянии в детском возрасте проявляется поражением печени.

Стабильно высокий уровень трансаминаз и признаки холестаза у детей могут быть основанием для селективного скрининга дефицита *A1AT*.

Литература

1. World Health Organization: Alpha-1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. Bull World Health Organ. 1997; 75: 397–415.
2. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. J. Intern. Med. 2014; 276 (4): 311–335.
3. Пузырев В.П., Савюк В.Я. Молекулярные основы и клинические аспекты недостаточности α_1 -антитрипсина. Пульмонология. 2003; 1: 105–115.
4. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. J. Biol. Chem. 1994; 269 (23): 15957–15960.
5. Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha-1 antitrypsin. J. Biol. Chem. 1999; 274: 9548–9555.
6. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha-1 antitrypsin accumulation in the liver. Nature. 1992; 357: 605–607.
7. Carrel RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency – a model for conformational diseases. N. Engl. J. Med. 2002; 346: 45–53.
8. Wu SS, de Chadarevian JP, McPhaul L, Riley NE, van Leeuwen FW, French SW. Coexpression and accumulation of ubiquitin 11 and ZZ proteins in livers of children with alpha-1 antitrypsin deficiency. Pediatr. Dev. Pathol. 2002; 5: 293–298.
9. Teckman JH, Jain A. Advances in alpha-1-antitrypsin deficiency liver disease. Curr. Gastroenterol. Rep. 2014; 16 (1): 367.
10. Жигальцова О.А., Даниленко Н.Г., Сивицкая Л.Н., Силивончик Н.Н. Альфа-1-антитрипсин: функциональные особенности, генетический полиморфизм и эффекты недостаточности. Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал. 2015; 2 (42): 73–80.
11. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Дефицит α_1 -антитрипсина и хроническая обструктивная болезнь легких. Пульмонология. 2007; 3: 103–109.
12. Long GL, Chandra T, Woo SLC, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha-1-antitrypsin and the gene for the S variant. Biochemistry. 1984; 23: 4828–4837.
13. Laura Fregonese, Jan Stolk. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2008, 3:16: <http://www.orphandb.com/content/3/1/16>
14. Stollerand JK, Aboussouan LS. A review of α_1 -antitrypsin deficiency. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012; 185 (3): 246–259.
15. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors α_1 -antitrypsin and α_1 -antichymotrypsin. Biochem. Soc. Trans. 2002; 30: 93–98.
16. Maria A. De Tommaso, CL. Rossi, C. AF. Escanhoela, HG. Serra, CS. Bertuzzo, Gabriel Hessel. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency by DNA analysis of children with liver disease. Gastroenterologia Pediatrica. 2001; 38, 1: 63–68.
17. Teckman JH, Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2015; 9 (2): 261–268.
18. Blanco I, de Serres FJ, Carcaba V, Lara B, Fernandez-Bustillo E. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency PI*Z and PI*S Gene Frequency Distribution Using on Maps of the World by an Inverse Distance Weighting (IDW) Multivariate Interpolation Method. Hepatitis Monthly. 2012; 12 (10 HCC): e7434. doi:10.5812/hepatmon.7434.
19. Luisetti M, Seersholm N. Alpha-1 antitrypsin deficiency: 1. Epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency. Thorax. 2004; 59: 164–169.
20. Асанов А.Ю., Симонова О.И., Аверьянова Н.С., Тапыев Е.В., Пинелис В.Г. Частоты мутаций и полиморфизма генов α_1 -антитрипсина в выборке детей европейской части страны с болезнями органов дыхания. Материалы XIII Российского конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». М., 2014: 124–125.
21. Чучалин А.Г., Кронина Л.А., Воронина Л.М., Самильчук Е.И. Случай сочетания муковисцидоза с дефицитом альфа-1-антитрипсина. Пульмонология. 1994; 4 (3): 82–85.
22. Полякова С.И., Асанов А.Ю., Аверьянова Н.С., Потанов А.С., Тапыев Е.В., Пинелис В.Г. Сочетание альфа1-антитрипсиновой недостаточности гомозиготным гемохроматозом 1-го типа у девочки 6 лет. Российский педиатрический журнал. 2011; 2: 52–54.
23. Шапошникова Н.А., Шулятьев И.С., Варванина Г.Г., Дроздов В.Н. Клиническое значение наследственного и приобретенного дефицита альфа-1-антитрипсина у больных циррозом печени и болезнью Вильсона–Коновалова. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2010; (10): 12–16.
24. Самильчук Е.И., Гаспарян А.В., Лактионов К.К., Чучалин А.Г. ТаqI полиморфизм в 3' фланкирующей области гена *PI* при хронической патологии органов дыхания и раке легкого. Пульмонология. 1996; 6: 17–21.
25. Строковой Т.А., Бугаева М.Э., Zubovich А.И., Прохорова И.В., Павловская Е.В., Сурков А.Г. Недостаточность α_1 -антитрипсина у детей. Тезисы Московского городского съезда педиатров. М., 2015: 96–97.
26. De Tommaso AM, Rossi CL, Escanhoela CA, Serra HG, Bertuzzo CS, Hessel G. Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency by DNA analysis of children with liver disease. Arq. Gastroenterol. 2001; 38 (1): 63–68.
27. Stoller JK, Aboussouan LS. A review of alpha1-antitrypsin deficiency. Am. J. Respir. Care Med. 2012; 185 (3): 246–259.
28. Lang T, Muhlbauer M, Strobelt M, Weidinger S, Hadorn HB. Alpha-1-antitrypsindeficiency in children: liver disease is not reflected by lower serum levels of alpha-1-antitrypsin—a study on 48 pediatric patients. Eur. J. Med. Res. 2005; 10 (12): 509–514.
29. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. Am. J. Gastroenterol. 2008; 103 (8): 2136–2141.
30. Kok KF, Wahab PJ, de Vries RA. Heterozygosity for alpha1-antitrypsin deficiency as a cofactor in the development of chronic liver disease. Ned. Tijdschr. Geneesk. 2005; 149 (37): 2057–2061.
31. Каримов И.З., Шавловский М.М., Назаров П.Г. Изменение содержания С-реактивного белка и других белков острой фазы в крови больных вирусным гепатитом С. Цитокины и воспаление. 2004; 3 (4): 42–46.
32. Volpert D, Molleston JP, Perlmutter DH. Alpha1-antitrypsin deficiency-associated liver disease progresses slowly in some children. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2000; 31 (3): 258–263.
33. Первакова М.Ю., Эмануэль В.Л., Суркова Е.А., Мазинг А.В., Лапин С.В., Ковалева И.С., Сысоева С.Н. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (10): 28–32.