

Молекулярне підґрунтя дефіциту ААТ

Дефіцит ААТ є генетично зумовленим розладом, спричиненим мутацією гена СЕРПІН 1 (також позначається як PI) (рис. 1), локалізованим на довгому плечі 14 хромосоми. На даний час ідентифіковано понад 130 варіантів цього гена, які пов'язані зі зниженням концентрації ААТ у сироватці або порушення його функції.

Серпіни, такі, як А1АТ структурно складаються з трьох β -листів (А-С) і восьми чи дев'яти α -спіралей (А-І) взаємодіють з петлею, що містить залишки, які діють як псевдосубстрат для протеїнази [9, 13]. У випадку А1АТ, залишок метіоніну в положенні 358 поліпептидного ланцюга (рис. 2) має вирішальне значення для взаємодії з нейтрофільною еластазою. Зв'язування протеїнази призводить до конформаційної зміни в білку ААТ, у результаті чого фермент розщеплює реактивний центр петлі, що рухається до протилежного полюса білка, приймаючи приєднану до нього протеїназу, перед вставкою в β -лист А. У результаті відбувається структурна деформація протеїнази, що є ключем до гальмівної функції серпіну [12]. Серпіни в звичайному стані є метастабільними, але стають більш стійким під час гальмування протеїнази. Це робить їх схильними до аберантних структурних утворень. У

результаті генетичних мутацій білок змінює свою структуру [28].

Фенотипні варіанти білка ААТ класифікують в системі, що визначається як система PI (PI, protease inhibitor). Класифікація виникла на підставі техніки ізоелектричного фокусування (IEF, isoelectric focusing), що полягає в розділі білків у поліакриламідних гелях, які мають відповідний градієнт рН. Відмінності в електрофоретичній рухливості зумовлені іншою ізоелектричною точкою білка ААТ, тому варіант із заміненою амінокислотою є основою для ідентифікації фенотипу ААТ: варіанти ААТ, позначені початковими літерами алфавіту, характеризує нижче рН ізоелектричної точки (заміна амінокислоти на більш кислу) і більшу дистанцію міграції на гелі. Варіанти з більш лужною ізоелектричною точкою, менше рухливі – позначаються кінцевими літерами алфавіту. Під час електрофоретичного розділу утворюється найчастіше декілька смужок білка ААТ, що виникає з різного ступеня його гліколізації. Найбільш поширені правильні варіанти позначаються літерою М (відповідно М1А і М1V також М2-М4, що є комбінаціями клінічно неістотних варіантів Ala²¹³ Val або Arg¹⁰¹ His і Glu³⁷⁶ Asp) і характеризуються середньою електрофоретичною рухливістю [8, 11, 13].

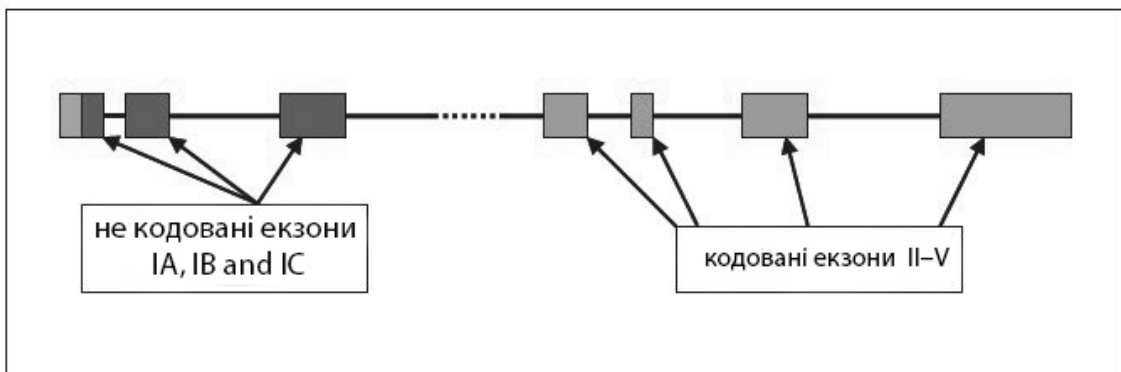


Рис. 1. Структура гена ААТ [29].

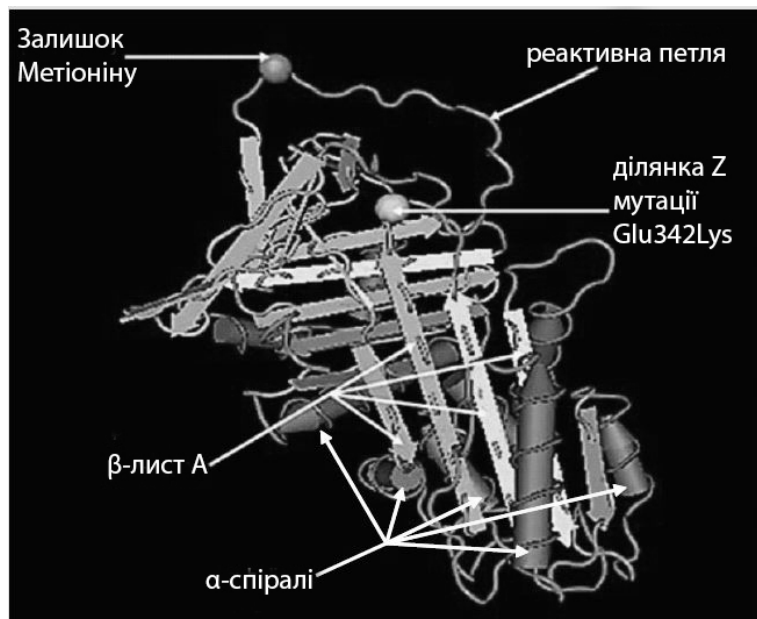


Рис. 2. Структура ААТ [29].

Для клінічних і практичних цілей введено поділ варіантів ААТ на 4 класи, залежно від концентрації і функції даного типу в плазмі. Родину правильних варіантів ААТ визначають як P1*M. Це є найчастіше розповсюджені алелі гена ААТ в європейській популяції (близько 95 % осіб), що забезпечує нормальну концентрацію та функцію цього інгібітора в плазмі. Наступний клас становлять дефіцитні варіанти, білкові продукти яких піддаються внутрішньоклітинній акумуляції або деградації в печінці, ведучи до значного спаду концентрації ААТ в крові. У цій групі знаходяться два найчастіші для дефіциту ААТ алелі – Z і S. Черговий клас становлять позбавлені експресії алелі, так звані null – рідкісні генетичні варіанти ААТ, білкові продукти яких не виявляються в крові. Останній клас творять генетичні варіанти ААТ, які кодуєть дисфункційні білки [4, 6, 8, 11].

В основі варіанта Z (дуже вільна міграція) лежить поодинокі точкова мутація, що веде до заміни глютамінової кислоти лізином в кодоні 342 (Glu³⁴²>Lys). Мутація Z спричиняє втрату стабільності просторової структури інгібітора, ефектом чого є полімеризація новосинтезованих частинок ААТ усередині гепатоцитів. Мутовані форми ААТ, які покидають печінку, характеризуються зниженою здібністю інгібування протеаз. У хворих із генотипом P1*ZZ концентрація ААТ в сироватці становить 10–15 % нормальної концентрації. Білковий продукт алелі S (вільна міграція), порівняно з продуктом найпоширенішого білкового алелю M, відрізняється заміщенням глютамінової кислоти на місце валіну в позиції 264 (Glu²⁶⁴>Val). Та поодинокі зміна амінокислоти в кодованому білку веде до внутрішньоклітинної деградації інгібітора. Гомозиготи P1*SS характеризуються приблизно на 40 % нижчою концентрацією ААТ у сироватці, ніж в осіб з правильним генотипом [6, 8, 27].

Хто повинен пройти обстеження?

Відповідно до рекомендацій Американського торакального товариства та Європейського респіраторного товариства, до скринінгового обстеження включено такі групи пацієнтів:

- усі дорослі пацієнти з клінічними проявами ХОЗЛ або емфіземи легень;
- дорослі пацієнти з астмою, якщо обструкція не повністю відновлюється після лікування;
- клінічно безсимптомні особи з персистою бронхіальною обструкцією, виявленою функціональними тестами та при виявленні факторів ризику (наприклад куріння, професійні шкідливості тощо);
- особи з нез'ясованою хворобою печінки;
- дорослі пацієнти з некротичним панікулітом (запальні та некротичні вогнища підшкірної жирової клітковини);
- брати і сестри пацієнтів з ААТН.

Всі пацієнти повинні бути поінформовані про ризики при проведенні обстеження ААТ, у тому числі ризик психологічного дискомфорту і генетичної дискримінації [4, 7, 18, 30].

Епідеміологія природженого дефіциту ААТ

Останнім часом у науковій літературі можна зустріти інформацію про більші чи менші, за величиною груп, епідеміологічні дослідження. Вони поступово змальовують загальну епідеміологічну картину в

людській популяції щодо проблеми ААТН. Зокрема, de Serres і Blanco (2012) представили результати генетичного епідеміологічного дослідження для розробки оцінки частоти двох основних алелів, пов'язаних з недостатністю (PiS і PiZ) в 97 країнах по всьому світу. Більше ніж у 190 млн людей виявлено дефіцитний генотип, а саме – володіють щонайменше одним з цих алелів. З точки зору тяжкої недостатності, 0,1 % з цих людей має генотип ZZ, більшість яких проживає в Європі й Північній Америці [10, 13].

Інше дослідження, опубліковане у 2002 році, згідно з даними із 58 країн. Вивчалось загальне число пацієнтів із дефіцитом ААТ (зважаючи на фенотип P1: ZZ, SZ та SS) з розрахунку на 3,4 млн осіб у країнах Північної і Західної Європи. Вищою є частота наявності алелі Z, яка в середньому складає 14:1000, натомість наявність гомозигот P1*ZZ визначається на 1:5000 [19].

Епідеміологічне дослідження в 21 європейській країні (разом у групі 75 390 осіб) дає середню частоту наявності фенотипу тяжкого дефіциту ААТ (P1*ZZ) в європейській популяції 1:4727. Високу частоту алелі Z констатовано в північній і західній Швеції (2,3–3,2 %), Естонії та Литві, а також серед жителів Данії. Деяко рідше (2–2,25%) алель Z виявлено в північній Франції (Нормандія, Бретань), Ірландії і південній Англії. Решта Європи характеризується меншою ніж 2 % частотою варіанта Z. Найнижчу частоту варіанта Z констатовано в південній Італії. Частота гомозигот P1*ZZ є теоретично рівною квадрату частоти алелі Z. Розподіл гомозигот P1*ZZ зменшується з північного сходу (1:500–5000) у південно-західному напрямі (1:1000–90 000) [6, 19, 21].

У Польщі більшість досліджень стосується дорослих осіб і були виконані у відносно невеликих групах, разом обіймаючи 2653 особи. Частота наявності алелі P1*S і P1*Z на підставі аналізу доступних даних становить відповідно 14,5:1000 та 10,9:1000. Це дозволяє оцінити частоту фенотипу P1*ZZ на 1:9110. У польській популяції, що становить 38 млн, може бути близько 4189 осіб з фенотипом P1*ZZ. Дані, що стосуються частоти наявності дефіциту ААТ в польських дітей, походять з єдиного опублікованого на цю тему дослідження. Обстежено 741 новонародженого з багатьох регіонів країни, в яких позначають фенотип ААТ методом ізоелектричного фокусування в поліакриамідному гелі. Отримані результати демонструють рідшу наявність дефіцитних варіантів у дітей, ніж в популяції дорослих осіб – алель S виявлено з частотою 9,4:1000, а алель Z – 6,7:1000 [8, 14].

За даними Американського торакального товариства, вважається, що 60–100 тис. американців мають ААТН, а з 14 млн американців із ХОЗЛ у 2 млн діагностують емфізему легень. З 965 пацієнтів з емфіземою легень 2–3 % мали ААТН, що при зіставленні даних свідчить про те, що близько 63 тис. американців страждають від емфіземи легень внаслідок ААТН. За даними J. K. Stoller (2005), з моменту появи симптоматики до встановлення діагнозу проходить, як правило, не менше 7 років [1, 25].

На жаль, в Україні відсутні офіційні дані щодо епідеміології ААТН. Доцільність проведення скринінгу для виявлення ААТН не є актуальною, що пов'язано не

тільки з технічними труднощами, але і з тим, що ця патологія віднесена до розряду “рідкісних”. На жаль, діагноз ААТН ґрунтується тільки на визначенні концентрації ААТ в сироватці крові без генетичної верифікації [1].

Проте протягом останніх років розпочалися регіональні (Донецьк, Тернопіль) дослідження, ініційовані медичними університетами за підтримки польських партнерів (Варшава). Також проводяться тренінги і стажування в європейських лабораторіях та клініках. Українські науковці беруть участь у міжнародних медичних форумах щодо ААТН (Варшава, 2012).

У ряді європейських країн скринінгове дослідження на ААТН проводиться поряд із обстеженням на фенілкетонурію, уроджений гіпотиреоз, муковісцедоз, адреногіперплазію і недостатність біотинідази. Виявлення цих захворювань, їх раннє лікування або профілактика є економічно вигіднішими, ніж утримання хворих або їх лікування при діагностиці в більш пізньому віці [1, 6].

Діагностичні методи ААТН – переваги і недоліки

Повна діагностика дефіциту ААТ опирається на комбінації кількісних і якісних методів, таких, як: вимір концентрації в крові ААТ, фенотипування, генотипування і, в нечисленних випадках, аналіз секвенції ДНК. Повна верифікація діагнозу клінічного дефіциту ААТ і підтвердження результату кількісного позначення можливі тільки на молекулярному рівні. В разі дефіциту ААТ таку верифікацію забезпечує всього лише ідентифікація фенотипу або генотипу інгібітора. У зв'язку з цим, вважається, що для діагнозу дефіциту ААТ необхідне підтвердження позитивного результату дослідження, отриманого щонайменше двома діагностичними методами (кількісний аналіз + фенотипування, кількісний аналіз + генотипування, фенотипування + генотипування). Найповнішу діагностичну інформацію дає поєднання кількісного аналізу з фенотипуванням [4, 8, 13].

Первинним дослідженням, яке проводять у осіб з підозрою дефіциту цього інгібітора протеаз, є вимірювання концентрації ААТ в сироватці/плазмі крові при використанні імунологічних або кольориметричних методів. Найчастіше застосовуваним методом є імунонефелометрія, а також: імуноелектрофорез, радіальна імунодифузія та ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Концентрація ААТ може бути виражена в міліграмах на децилітр (мг/дл) або в мікромолях на літр (ммоль/літра або мМ). Нормальна величина концентрації ААТ в сироватці здорових осіб, визначена за допомогою методу імунонефелометрії, становлять 83–220 мг/дл, а методом імуноелектрофорезу – 150–330 мг/дл. Поява зниженого показника концентрації ААТ в досліджуваній особі (нижче порогової величини) створює підстави для подальших якісних досліджень. Аналогічно мають бути дообстежені особи з нормальними, але пороговими результатами щодо визначення концентрації ААТ (12–35 мм або 90–130 мг/дл) [4, 5, 7].

Повсюдно використовуваним методом ідентифікації варіантів ААТ є техніка IEF, яка дає можливість визначити фенотип даного циркулюючого білка. Цей метод вважається “золотим стандартом” у діагностиці ААТН. Невеликі зміни постійної електролітичної дисоціації інгібітора дозволяють диференціювати варіанти шля-

хом електрофорезу ААТ у поліакриламідному гелі в градієнті рН 4,2–4,9. IEF ідентифікує майже всі варіанти ААТ, за винятком варіантів типу null. Проте, крім цих переваг, метод є технічно досить складним і дуже трудомістким. З огляду на складну мікрогетерогенність, що виникає з глікозиляції та значного числа варіантів ААТ, вона вимагає великого досвіду і вміння інтерпретації результатів. Ще однією особливістю проведення фенотипування є те, що воно не розпізнає варіантів ААТ, що не піддаються експресії. Існують також рідкісні різновиди інгібітора серинових протеаз з ідентичною або незначно різним значенням ізоелектричної точки [7, 8, 13].

Існує багато технік генотипування, які були розроблені з метою розпізнання дефіциту ААТ. Більшість з цих методів полягає у безпосередній ідентифікації змін в гені ААТ (мутації в locus PI), відповідальної за виникнення дефіциту, і дає можливість діагностувати мутації майже з 100 % достовірністю. У рутинній молекулярній діагностиці ААТН простежується присутність двох найчастіше розповсюджених мутацій – Z і S [4, 8, 15].

Більшість методів ідентифікації мутації опирається на результат полімеразної ланцюгової реакції відповідної ділянки ДНК (PCR, polymerase chain reaction). Основним матеріалом, який беруть у пацієнта з метою виконання генетичного аналізу, є ДНК, ізольована з лейкоцитів периферичної крові, або з клітин іншої тканини (епітеліальні клітини слизової оболонки ротової порожнини), а також зразок крові на бібулі [11, 13, 18].

Аналіз послідовності ДНК дозволяє виявити наявність нуклеотидних мутацій, тобто визначити генетичні варіанти в досліджуваному фрагменті ДНК. Це дорогий і трудомісткий метод, що вимагає дублювання технікою PCR 7 екзонів гена ААТ і, власне, проведення їх секвенціювання. Цю техніку не застосовують щоденно в діагностиці дефіциту ААТ, а лише у випадках підозри рідкісних або нових варіантів ААТ (нетиповий зразок IEF, низька концентрація ААТ при нестачі мутації Z або S тощо) [8, 27, 29].

У підсумку щодо діагностики ААТН слід зауважити, що підтвердження в досліджуваній особі концентрації ААТ нижче 130 мг/дл вимагає проведення подальших якісних досліджень. На даний час “золотим стандартом” і підставою для проведення верифікації клінічного діагнозу залишається фенотипування ААТ методом IEF. Включення генотипування в алгоритм діагностичного дослідження значно полегшує і пришвидшує діагноз, оскільки дає можливість правильно визначити генотип в майже 96 % хворих із дефіцитом ААТ. Однак варто підкреслити, що в разі рідкісних мутацій необхідне виконання додаткового аналізу фенотипу секвенціювання гена ААТ (рис. 3) [8].

Досягнення в галузі генетичних ресурсів, такі, як проект генома людини і розвиток технологій сканування генома, роблять подальші дослідження генів, які можуть модифікувати клінічний фенотип ААТН більш практично цінними.

Так, як групи пацієнтів із верифікованим лабораторним діагнозом потрапляють ті особи, у кого є яскрава клінічна картина захворювання, то скринінгове дослідження на генотипи PI повинно носити більш масштабний характер, з метою запобігання розвитку захворювання і раннього застосування терапії.

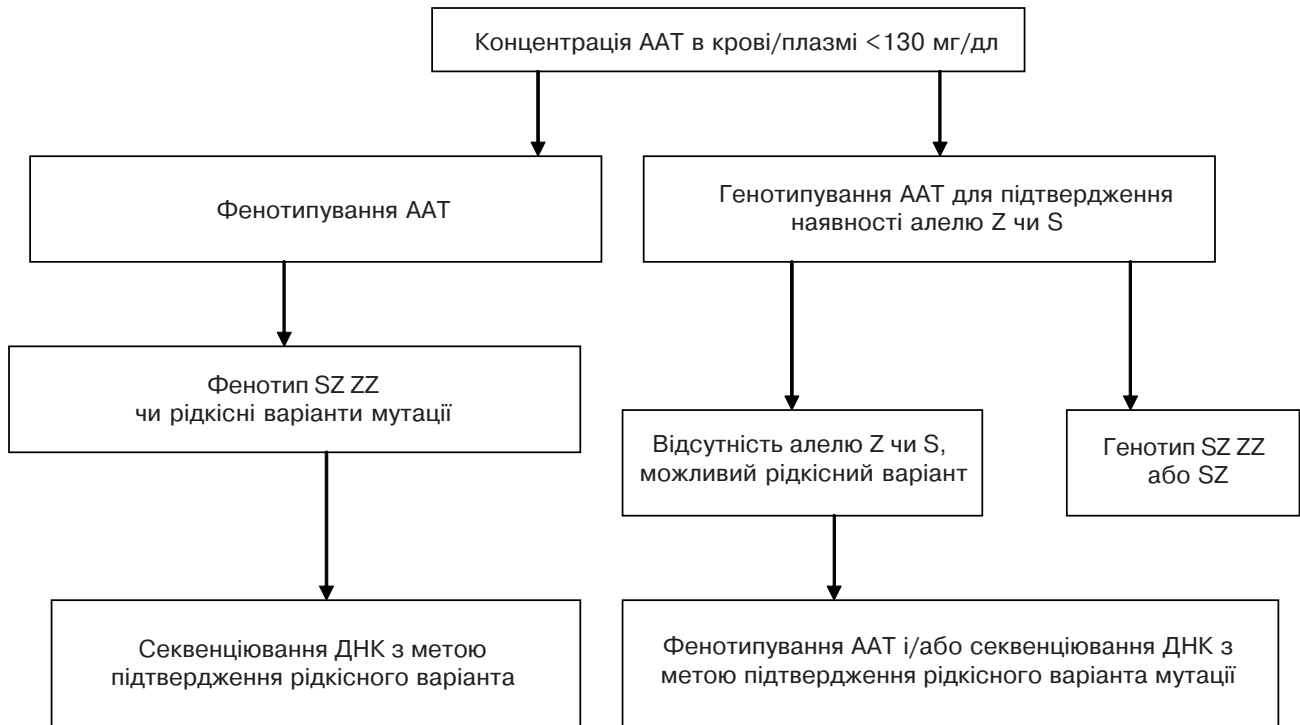


Рис. 3. Схема діагностичного дослідження при підозрі ААТН [8].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Колесникова Е. В. Альфа-1-антитрипсиновая недостаточность : современный взгляд на проблему // Сучасна гастроентерологія. – 2008 – № 2 (40). – 93 с.
- Про затвердження стандартизації медичної допомоги при ХОЗЛ : наказ МОЗ України № 555 від 27.06.2013.
- Aboussouan L. S. Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: a review. *Respir* / L. S. Aboussouan, J. K. Stoller // *Med.* – 2009. – Vol. 103. – P. 335–341.
- ATS/ERS Statement: Standards for the Diagnosis and Management of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. Vol. 168. –P. 818–900.
- Bals R. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Patophysiology, Diagnosis and Treatment* / R. Bals, T. Kohnlein // Thieme, Stuttgart, 2009.
- Estimated numbers and prevalence of Pi*S and Pi*Z alleles of α -1-antitrypsin deficiency in European countries / I. Blanco, F. J. de Serres, E. Fernandez-Bustillo [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2006. – Vol. 27. – P. 77–84.
- Brode S. K. Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease / S. K. Brode, S. C. Ling, K. R. Chapman // *CMAJ.* – 2012. – Vol. 184(12). – P. 1365-1371.
- Diagnosis and treatment of patients with alpha-1 antitrypsin (alpha-1 AT) deficiency / J. Chorostowska-Wynimko, E. Nizankowska-Mogilnicka; A. Bakula [et al.] // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2010. – Vol. 78(5). – P. 348-355.
- Davies M. J. The molecular aetiology of the serpinopathies / M. J. Davies, D. A. Lomas // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40(6-7). – P. 1273–1286.
- Serres de F. J. Prevalence of a1-antitrypsin deficiency alleles Pi*S and Pi*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes Pi*MS, Pi*MZ, Pi*SS, Pi*SZ, and Pi*ZZ: a comprehensive review / F. J. de Serres, I. Blanco // *Ther. Adv. Respir. Dis.* – 2012. – Vol. 6(5). – P. 277–295.
- Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk / D. L. DeMeo, E. K. Silverman // *Thorax.* – 2004. – Vol. 59(3). – P. 259–264.
- Huntington J. A. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation / J. A. Huntington, R. J. Read, R. W. Carrell // *Nature.* – 2000. – Vol 407(6806). – P. 923–926.
- Recent advances in 6-1-antitrypsin deficiency-related lung disease / Brebner A. Judith, Stockley A. Robert // *Expert. Rev. Respir. Med.* – 2013. – Vol. 7(3). – P. 213–229.
- The prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in a representative population sample from Poland. / M. P. Kaczor, M. Sanak, M. Libura-Twardowska, A. Szczeklik // *Respir. Med.* – 2007. – Vol. 101. – P. 2520–2525.
- Kohnlein T. Alpha1-antitrypsin deficiency / T. Kohnlein, K. Rifai // *Internist (Berl).* – 2010. – Vol. 51, Suppl 1 – P. 269–276.
- Kohnlein T. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency – Clinical Aspects and Management / T. Kohnlein, T. Welte // *Uni-Med, Breme, 2007.*
- Laurell C. B. The electrophoretic 6-1-globulin pattern of serum in 6-1-antitrypsin deficiency / C. B. Laurell, S. Eriksson // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1963. – Vol. 15. – P. 132–140.
- Alpha-1 antitrypsin deficiency targeting testing and augmentation therapy: a Canadian Thoracic Society clinical practice guideline / D. D. Marciniuk, P. Hernandez, M. Balter [et al.] // *Can. Respir. J.* – 2012. – Vol. 19. – P. 109–116.
- Miravittles M. Laboratory testing of individuals with severe a-1-antitrypsin deficiency in three European centres / M. Miravittles, C. Herr, I. Ferrarotti // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol. 35. – P. 960–968.
- A review of alpha-1 antitrypsin deficiency / J. Ranes, J. K. Stoller // *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* – 2005. – Vol. 26(2). – P. 154–166.
- Rare 6-1-antitrypsin variants: are they really so rare? / F. Rodriguez-Frias, M. Miravittles, R. Vidal [et al.] // *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2012. – Vol. 6(2). – P. 79–85.
- Serapinas D. Sensitivity of alpha-1 antitrypsin level for inherited deficiency detection in COPD patients/ D. Serapinas, R. Sakalauskas // *Pneumologia.* – 2012. – Vol. 61(1). – P. 34–36.
- Diagnosis of 6-1-antitrypsin deficiency: an algorithm of quantitation, geno-typing, and phenotyping / M. R. Snyder, J. A. Katzmann, M. L. Butz [et al.] // *Clin. Chem.*– 2006. – Vol. 12. – P. 2236–2242.

24. Therapeutic efficacy of alpha-1 antitrypsin augmentation therapy on the loss of lung tissue: an integrated analysis of 2 randomised clinical trials using computed tomography densitometry / R. A. Stockley, D. G. Parr, E. Piitulainen [et al.] // *Respir. Res.* – 2010. – Vol. 11. – P. 136 p.
25. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with α_1 antitrypsin deficiency / J. K. Stoller, G. L. Snider, M. L. Brantly [et al.] // *Pneumologie.* – 2005. – Vol. 59. – P. 36–68.
26. Struniawski R. Diagnostyka molekularna niedoboru alfa-1 antytrypsyny w praktyce klinicznej. / R. Struniawski, A. Szpechcinski, J. Chorostowska-Wynimko // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2008. – Vol. 76. – P. 253–264.
27. Survival in severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ) / H. A. Tanash, P. M. Nilsson, J-A. Nilsson [et al.] // *Respir. Res.* – 2010. – Vol. 11. – P. 44.
28. Whisstock J. C. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding / J. C. Whisstock, S. P. Bottomley // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – Vol. 16(6). – P. 761–768.
29. Wood A. M. Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment / A. M. Wood, R. A. Stockley // *Respiration.* – 2007. – Vol. 74(5). – P. 481–492.
30. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; 2010. Available: www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf (accessed 2012 June 13).

Отримано 05.08.14