

УДК 575.1

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ФЕРМЕНТОВ ЩЕЛОЧНОЙ  
ФОСФАТАЗЫ, БИЛИРУБИНА И АМИЛАЗЫ ПРИ МУТАНТНЫХ  
АЛЛЕЛЯХ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА****А.Б.ИСМАЙЛОВА, Р.А.КУЛИЕВ****Бакинский Государственный Университет  
aygunmail@rambler.ru**

*Установлено, что в большинстве случаев (75%) заболеваемости циррозом печени, желтухой и др. нарушений желудочно-кишечного тракта в сыворотке крови наблюдается недостаточность ингибитора протеаз альфа-1-антитрипсина, обусловленная мутантными аллелями PiS и PiZ. У подобных больных был изучен полиморфизм щелочной фосфатазы, билирубина и амилазы. При этом в экспериментальной группе в крови обнаруживается значительный сдвиг уровня количества ферментов печени и поджелудочной железы (до 10-15 раз) в сравнении с контрольной.*

**Ключевые слова:** мутации, наследственные заболевания, ферменты, билирубин.

Альфа-1-антитрипсин ( $\alpha 1AT$ ) синтезируется в гепатоцитах печени и является ингибитором протеаз (трипсина, коллагеназы, эластазы, протеаз полиморфно-ядерных нейтрофилов). В печени при нарушении синтеза  $\alpha 1AT$  обнаруживаются скопления патологического белка, что вызывает формирование цирроза печени, желтухи и нарушений функций желудочно-кишечного тракта (1,5). В настоящее время известно более 90 аллелей ингибитора протеаз  $\alpha 1AT$  и среди них такие аллели как PiS, PiZ, PiP, PiI вызывают заболевания печени и легких. Нормальным считается аллель PiM, который определяет нормальный фенотип PiMM (7,8). Недостаточность  $\alpha 1AT$  диагностируется примерно у 1 из 2000 человек. Патологический ген расположен в 14 хромосоме в длинном плече в регионе 14q31–q32. Этот ген определяется двумя независимыми аллелями, располагающимися в одной хромосоме, наследующимися кодоминантно. В основе изменений гена лежит замена одной аминокислоты другой. Так, при мутантом аллеле PiZ в 342 позиции первичной структуры белка глутаминовая кислота замещена лизином, что приводит к дефициту сиаловой кислоты. При мутантном аллеле PiS в составе полипептида имеется замена в нуклеотиде аминокислоты валин на глутаминовую кислоту в 224-ой позиции белка.

Клинические проявления дефицита альфа-1-антитрипсина со стороны печени многообразны. На сегодняшний день принято считать, что одной из главных причин поражения печени является агрегация плохо-растворимого PiZ белка в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов (4,6). Примерно до 85% синтезированного Z-белка неспособно покинуть гепатоцит. Такие скопления дефектного протеина, непроникающего через мембраны клетки, можно обнаружить в виде кислых включений, окрашивающихся по Шиффу. Скорость аккумуляции патологического продукта гена зависит от двух причин: скорости синтеза белка и температуры тела (9). Полимеризация Z-продукта очень быстро происходит при температуре тела 41°C. Этим можно попытаться объяснить тяжелое спорадическое поражение печени у гомозиготных новорожденных и младенцев, склонных к выраженному гипертермическому ответу даже при легких простудах. Таким пациентам показано экстренное снижение температуры тела даже при субнормальных значениях гипертермии. Поражение печени могут быть обнаружены в младенческом возрасте или у взрослых. Из всех новорожденных и младенцев гомозиготных по PiZZ фенотипу явные клинические проявления гепатита и цирроза могут быть обнаружены у 10% (2). Примерно 10% пациентов с клиническими симптомами в младенчестве умирают к 8 годам. В странах с развитой трансплантационной хирургией альфа-1-антитрипсиновая недостаточность, наряду с атрезией желчевыводящих протоков, является ведущим показанием к трансплантации печени у детей. Большинство новорожденных (до 70%) PiZ - гомозигот имеют субклинические изменения со стороны печеночных биохимических проб. Прогноз в этой группе пациентов благоприятный, большинство из них к 18 годам имеют нормальные показатели функций печени и лишь у 10% из них сохраняются изменения. С возрастом резко возрастает риск развития цирроза печени: до 20 лет этот риск составляет 3%, у пожилых – 30-50%. (1,3). В последнее время показано, что пациенты с альфа-1-антитрипсиновой недостаточностью склонны к инфицированию вирусом гепатита С. Как видно из вышеизложенного, роль альфа-1-антитрипсина в заболеваниях печени и нарушениях обменного процесса в организме большая.

Поэтому целью нашей работы явилось исследование таких ферментов в крови больных с мутантными PiS и PiZ аллелями альфа-1-антитрипсина, которые напрямую связаны с функцией печени, а также поджелудочной железы – щелочной фосфатазы, билирубина и амилазы.

### **Материал и методы**

На первом этапе работы для установления нормальных и мутантных фенотипов Pi аллелей альфа-1-антитрипсина были исследованы образцы сыворотки крови у сельчан – практически здоровых лиц репро-

дуктивного возраста, а также пациентов центральных районных больниц с заболеваниями печени и с другими симптомами желудочно-кишечного тракта в трех регионах Азербайджана: Казах, Сиязань и Хачмас методом аналитического изоэлектрофокусирования в полиакриламидной геле с рН 4,0-6,0. От обследуемых забор капиллярной крови производили в микропробирки «эппендорф» с антикоагулянтом. Сыворотку получали путем центрифугирования крови в центрифуге «эппендорф» (при 12000 об/мин) в течение 10-15 секунд. Перед изоэлектрофокусированием сыворотку разбавляли 1:5 дистиллированной водой.

Проведенный популяционный анализ сыворотки крови 919 человек из трех районов Азербайджана выявил: гетерозигот PiZ мутации – 32, гомозигот – 19 человек, гетерозигот PiS мутации – 22 человека, гомозигота один и один компаунд с фенотипом PiZS.

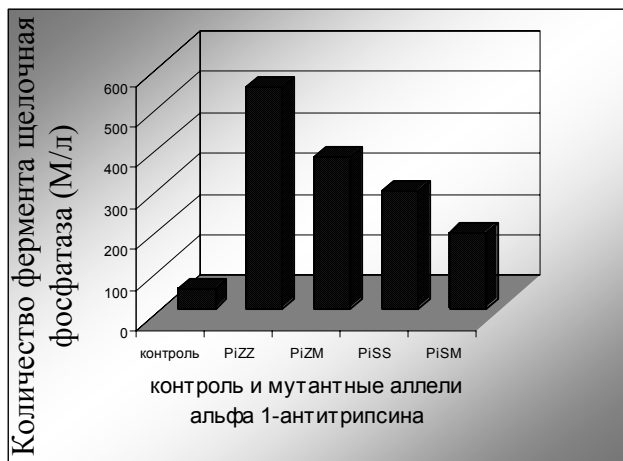
Количественное определение в сыворотке крови у больных с мутантными PiZ и PiS аллелями ферментов щелочной фосфатазы, билирубина и амилазы проводили на биохимическом анализаторе “Dimension” фирмы DADE BEHRING (США). Биохимический анализатор “Dimension” является закрытой системой, подключенный к компьютеру с пакетом программ. Для анализов использовали реактивы выпускаемые только фирмой DADE BEHRING (США). Используемые наборы для количественного анализа ферментов: **I) Амилаза:** Dimension clinical chemistry system Fleks reagent cartridge REF DF17A AMY; **II) Щелочная фосфатаза:** Dimension clinical chemistry system Fleks reagent cartridge REF DF22A ALP; **III) Общий билирубин:** Dimension clinical chemistry system Fleks reagent cartridge REF DF67A TBIL. Каждый из этих анализов требует от экспериментатора от 6-ти до 10-ти минут. Результаты исследования сравнивались с контрольной группой.

### Результаты

На рис. 1 представлено графическое распределение уровня фермента щелочной фосфатазы при нормальных и мутантных аллелях альфа-1-антитрипсина.

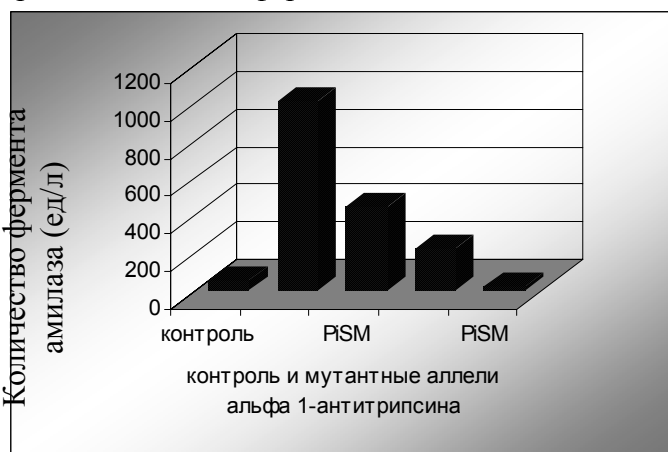
Щелочная фосфатаза (или фосфомоноэстераза), так же как и кислая фосфатаза относится к фосфомоноэстеразам, гидролизующим простые эфиры фосфорной кислот. Количество фермента щелочной фосфатазы в контрольной группе варьировало от 11,0-57,0 М/л при среднем 46,2 М/л ( $P < 0,005$ ). В экспериментальной группе у гетерозигот PiMZ количество фермента было 330,2-399,3 М/л, при среднем 370,0 М/л. У гомозигот PiZZ уровень количества щелочной фосфатазы варьировал от 520,2-590,0 М/л, при среднем 541,2 М/л. Это составляет увеличение при сравнении с контрольной группой в 8-11 раз. В экспериментальной группе у гетерозигот PiMS количество фермента было 158,5-200,0 М/л при среднем 186,0

М/л. У гомозигот PiSS уровень количества щелочной фосфатазы варьировал 245,0-302,0 М/л при среднем 287,0 М/л. Это составляет увеличение при сравнении с контрольной группой в 4-6 раз.



**Рис. 1.** Распределение уровня фермента щелочная фосфатаза при нормальных и мутантных аллелях альфа-1-антитрипсина ( $P < 0,005$ )

На рис. 2 представлен график распределения фермента амилазы, полученный нами в результате исследований. Амилазы являются основными ферментами катаболизма углеводов. Принято считать, что уровень альфа-амилазы в крови обусловлен не только секреторной деятельностью поджелудочной и слюнных желез, но также во многом обусловлен функциональным состоянием печени, поэтому для оценки деятельности поджелудочной железы необходимо исследовать относительную активность именно панкреатического изофермента.

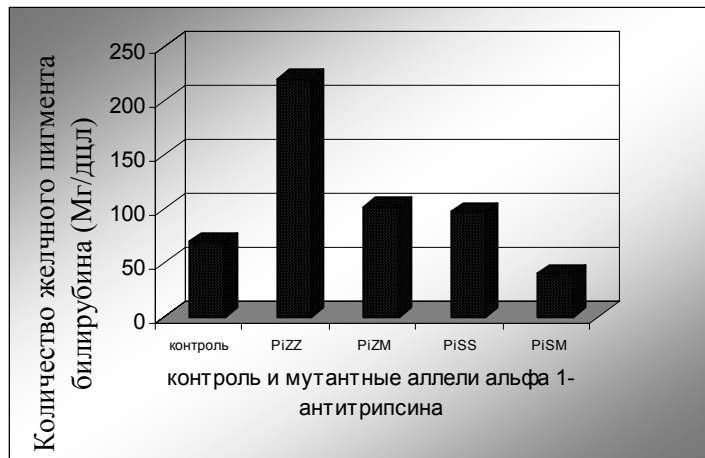


**Рис.2.** Распределение уровня фермента поджелудочной железы амилазы при нормальных и мутантных аллелях альфа-1-антитрипсина ( $P < 0,005$ ).

По полученным результатам в контрольной группе уровень количества фермента варьировал от 29,0-74,4 ед/л при среднем 52,4 ед/л ( $P < 0,005$ ). В экспериментальной группе у гетерозигот PiMZ количество фермента было 400,0 – 494,0 ед/л при среднем 446,0 ед/л. У гомозигот PiZZ уровень количества щелочной фосфатазы варьировал 799,0 – 1309,0 ед/л при среднем 1009,0 ед/л. Это составляет увеличение при сравнении с контрольной группой в 9-20 раз.

В экспериментальной группе у гетерозигот PiMS количество фермента было 15,8–77,4 ед/л при среднем 22,0 ед/л. Как видно, при сравнении с контролем здесь наблюдаем падение уровня количества амилазы до 2,3 раз. У гомозигот PiSS уровень количества фермента варьировал 196,0 - 263,2 ед/л при среднем 220,0 ед/л. Это составляет увеличение при сравнении с контрольной группой в 4 раза.

На рис.3 представлен график распределения фермента желчного пузыря билирубина, полученный нами в результате исследований Билирубин – водорастворимый пигмент крови, образующийся в результате распада гемопро-теидов и выделяющийся с желчью. В проведенных нами исследованиях количество билирубина в контрольной группе варьировало от 62,0-72,9 Мг/дцл, при среднем 69,8 Мг/дцл ( $P < 0,005$ ). В экспериментальной группе у гетерозигот PiMZ количество пигмента было 124,2-162,9 Мг/дцл, при среднем 101,9 Мг/дцл. У гомозигот PiZZ уровень количества билирубина варьировал 188,0-256,7 Мг/дцл при среднем 220,4 Мг/дцл. Это составляет трехкратное увеличение при сравнении с контрольной группой.



**Рис.3.** Распределение уровня желчного пигмента билирубина при нормальных и мутантных аллелях альфа-1-антитрипсина ( $P < 0,005$ ).

В экспериментальной группе у гомозигот PiSS количество фермента было 89,9-105,3 Мг/дцл при среднем 97,0 Мг/дцл. У гетерозигот PiMS уровень пигмента варьировал 12,6-79,5 Мг/дцл, при среднем 40,0 Мг/дцл. Как видим здесь выявлено значительно низкое значение билирубина.

Таким образом, биохимическое исследование сыворотки крови лиц с мутациями альфа-1-антитрипсина установил отклонения от нормы как в сторону увеличения, так и сторону уменьшения уровня ферментов – щелочная фосфатаза, билирубин и амилаза. В отдельных случаях (в группе носителей мутантных PiZZ и PiZM) мы наблюдали повышение показателей до 10-15 раз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Т.В., Доценко В.Л., Коровина Н.А. и др. Определение активности лейкоцитарной эластазы и  $\alpha$ 1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови при реактивных панкреатитах у детей // Росс. Мед. Вести, 2001, №1, с.62-65.
2. Бочков Н.П. Медицинская генетика. М., 1998, 498 с.
3. Cox D.W. Alpha-1 antitrypsin deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The molecular and metabolic basis of inherited disease, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
4. Fischer H.P, Ortiz-Pallardo ME, Ko Y, Esch C, Zhou H. Chronic liver disease in heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency PiZ // J.Hepatol., 2000, v.33, p.883–892.
5. Francavilla R., Castaneta S.P., Hadzic N. et al. Prognosis of alpha-1-antitrypsin deficiency-related liver disease in the area of pediatric liver transplantation // J. Hepatol., 2000, v.32, p. 986-992.

#### ALFA-1-ANTITRİPSİNİN MUTANT ALLELƏRİ ZAMANI QƏLƏVİ FOSFATAZA, BİLİRUBİN VƏ AMİLAZA FERMENTLƏRİNİN POLİMORFİZMİNİN ÖYRƏNİLMƏSİ

A.B.İSMAYİLOVA, R.Ə.QULİYEV

#### XÜLASƏ

Aşkar edilibdir ki, mədə-bağırsaq və qaraciyərin qüsurlundan əziyyət çəkən xəstələrdə çox hallarda (75%) qan zərdabında alfa-1-antitripsinin miqdarı az olur. Sarılıq və qaraciyərdə sirrozu olan xəstələrdə və o cümlədən, alfa-1-antitripsinin mutant PiS və PiZ allelərini daşıyanlarda qan zərdabında qələvi fosfataza, amilaza və bilirubin fermentlərinin polimorfizi öyrənilmişdir. Eksperimental qrupda aparılan biokimyəvi analiz kontrol qrupundan fərqli olaraq bu fermentlərin qan zərdabında böyük miqdarda (10-15 dəfə) artıq olduğunu aşkar etdi.

**Açar sözlər:** mutasiyalar, irsi xəstəliklər, fermentlər, bilirubin.

#### STUDY OF POLYMORPHISM OF BASE PHOSPHATASE, AMILASE AND BILIRUBIN IN THE CASE OF MUTANT ALLELS OF ALPHA-1-ANTITRYPSIN

A.B.ISMAYİLOVA, R.A.GULİYEV

#### SUMMARY

It is established, that in many cases (75%) of stomach and liver diseases blood serums of patients lack alpha-1-antitrypsin. The paper studies the polymorphism of base phosphates, amylase and bilirubin in blood during the mutant PiZ and PiS alleles of alpha-1-antitrypsin correlated with cirrhosis and jaundice. The levels of these ferments in the experimental group were much higher (10-15 times more) than those in the control group.

**Key words:** mutations, inherited diseases, ferments, bilirubin.

Поступила в редакцию: 10.05.2011 г.

Подписано к печати: 27.07.2011 г.