

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Marcin Kaczor

**SZYBKA METODA GENOTYPOWANIA
ALFA₁-ANTYTRYPSYNY
I JEJ ZASTOSOWANIE
W DIAGNOSTYCE MUTACJI PI*Z I PI*S
W LOSOWEJ PRÓBIE POPULACJI KRAKOWA**

Praca doktorska

Promotor: *Dr hab. med. Marek Sanak*

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJ
Kierownik Katedry: *Prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik*

Kraków, 2006

Serdeczne podziękowania pragnę przekazać:

Promotorowi niniejszej rozprawy, Panu Docentowi Markowi Sanakowi, Kierownikowi Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej UJ za pomoc przy jej tworzeniu, cenne wskazówki, sugestie i komentarze,

Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikiowi, Kierownikowi II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ za pomoc w realizacji i nadzór merytoryczny,

Pani Doktor Magdalenie Twardowskiej - Liburze za udostępnienie próbek DNA pochodzących od losowo wybranych mieszkańców dzielnicy Kazimierz (Kraków),

Pani Mgr Bernadecie Michalskiej za pomoc w pobieraniu materiału oraz pracownikom Pracowni Biochemii Klinicznej i Analityki a także Pracowni Immunologii za wykonanie części badań laboratoryjnych,

Panu Profesorowi Wiesławowi Jedrychowskiemu i Panu Profesorowi Andrzejowi Pająkowi za cenne uwagi dotyczące doboru próby populacyjnej,

oraz 550. Krakowianom, którzy poświęcając swój czas i przełamując lęk „przed igłą” uczestniczyli w niniejszym badaniu.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
1.1. Nazewnictwo	5
1.2. Historia badań nad antytrypsyną	5
1.3. SERPINY- rodzina inhibitorów proteaz serynowych	7
1.4. Gen PI – inhibitora proteaz	10
1.5. Budowa AAT	11
1.6. Warianty AAT	13
1.6.1. Warianty prawidłowe	14
1.6.2. Warianty niedoborowe	14
1.6.2.1. Wariant S (Glu ²⁶⁴ →Val)	14
1.6.2.2. Wariant Z (Glu ³⁴² →Lys)	15
1.6.2.3. Inne warianty niedoborowe	15
1.6.3. Warianty dysfunkcjonalne	15
1.6.4. Warianty typu <i>null</i>	16
1.7. Epidemiologia niedoborów AAT	17
1.8. Wątrobowa i pozawątrobowa produkcja AAT	19
1.9. Patofizjologia niedoborów AAT i objawy kliniczne	21
1.9.1. Akumulacja białka w hepatocytach i objawy wątrobowe	23
1.9.1.1. Patomechanizm uszkodzenia wątroby	23
1.9.1.2. Objawy wątrobowe	26
1.9.2. Zaburzenie równowagi proteazy-antyproteazy i objawy płucne	27
1.9.2.1. Patomechanizm uszkodzenia płuc	27
1.9.2.2. Objawy płucne	30
1.9.3. <i>Panniculitis</i> i ziarniniak Wegenera	33
1.9.4. Inne schorzenia związane z niedoborem AAT	34
1.10. Leczenie niedoborów AAT	35
1.10.1. Leczenie powikłań wątrobowych	35
1.10.2. Leczenie powikłań płucnych	35
1.11. Diagnostyka niedoborów AAT	37
1.11.1. Testy ilościowe	37
1.11.2. Testy jakościowe	38
1.11.3. Fenotypowanie za pomocą ogniskowania izoelektrycznego białka	38
1.11.4. <i>Real-time</i> PCR	39
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	41
3. MATERIAŁ I METODY	42
3.1. Losowa próba populacyjna	42
3.2. Pobranie materiału	45
3.3. Badanie ankietowe	45
3.4. Pomiar ciśnienia tętniczego	46
3.5. Standardowe oznaczenia z krwi żyłnej	46
3.6. Izolacja DNA	46
3.7. Genotypowanie metodą analizy miejsc restrykcyjnych z użyciem starterów mutagennych (test referencyjny)	47
3.7.1. Amplifikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz trawienie produktu w przypadku diagnostyki mutacji S	47
3.7.2. Amplifikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz trawienie produktu w przypadku diagnostyki mutacji Z	49

3.7.3.	Rozdział elektroforetyczny i obrazowanie produktu trawienia	51
3.8.	Genotypowanie metodą jakościowego <i>real-time</i> PCR	51
3.8.1.	<i>Real-time</i> PCR w przypadku diagnostyki mutacji S	53
3.8.2.	<i>Real-time</i> PCR w przypadku diagnostyki mutacji Z	54
3.9.	Ogniskowanie izoelektryczne AAT na cienkich żelach poliakrylamidowych.....	55
3.9.1.	Przygotowanie próbek (<i>sample pretreatment</i>)	56
3.9.2.	Ogniskowanie izoelektryczne	57
3.9.3.	Srebrzenie żelu	58
3.10.	Analiza statystyczna	58
4.	WYNIKI	60
4.1.	Losowa próba populacyjna	60
4.1.1.	I etap rekrutacji próby populacyjnej	60
4.1.2.	II etap rekrutacji próby populacyjnej	61
4.1.3.	Losowa próba populacyjna	61
4.2.	Podstawowe parametry	64
4.3.	Stężenie AAT w surowicy	68
4.4.	Genotypowanie niedoborów AAT metodą analizy miejsc restrykcyjnych	70
4.5.	Genotypowanie niedoborów AAT metodą jakościowego <i>real-time</i> PCR	72
4.6.	Częstości występowania alleli niedoborowych PI*S i PI*Z w losowej próbie populacji Krakowa	76
4.7.	Oczekiwane liczebności genotypów AAT	78
4.8.	Zależność stężenia AAT od genotypu	80
4.9.	Skuteczność diagnostyczna pomiaru stężenia AAT w wykrywaniu niedoborów częściowych (MZ, MS, SS)	82
4.10.	Ogniskowanie izoelektryczne AAT w żelach poliakrylamidowych	84
5.	DYSKUSJA	87
5.1.	Reprezentatywna próba populacyjna	87
5.2.	Genotypowanie AAT	89
5.3.	Częstości alleli niedoborowych PI*S i PI*Z	92
5.4.	Stężenie AAT w surowicy	97
5.5.	Wytyczne diagnostyki genetycznej niedoborów AAT	98
6.	WNIOSKI	102
7.	STRESZCZENIE	103
8.	SUMMARY	106
9.	UWAGI	108
10.	ZAŁĄCZNIKI	109
10.1.	Wzór imiennego listu z zaproszeniem	109
10.2.	Informacja dla uczestnika badania	111
10.3.	Pisemna zgoda na udział w badaniu	112
10.4.	Pisemna zgoda na badania genetyczne	113
10.5.	Pisemne wyrażenie zgody na informowanie o wynikach badań genetycznych i przetwarzanie danych osobowych	114
10.6.	Ankieta	115
11.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	118
12.	SPIS TABEL	119
13.	SPIS RYCIN	120
14.	SPIS WYKRESÓW	122
15.	PIŚMIENNICTWO	123

1. WSTĘP

1.1. Nazewnictwo

Nazwa „*alfa₁-antytrypsyna*” (AAT) wprowadzona została w latach 60. ubiegłego stulecia, dla określenia glikoproteiny hamującej aktywność trypsyny. Ponieważ główną funkcją tego białka jest blokowanie elastazy neutrofilowej, wprowadzono w następnych latach bardziej prawidłową nazwę – „*inhibitor proteaz I*” (PI 1), zwany także „*alfa₁-antyproteazą*” (*alfa₁-antyproteinazą*). Niemniej, ze względów zwyczajowych, powszechnie w piśmiennictwie polskim i anglojęzycznym nadal stosowana jest tradycyjna nazwa antytrypsyna i taka też konwencja została utrzymana w niniejszej pracy. Spośród innych stosowanych określeń można wymienić: „*antyelastaza*” i „*serpina I*”.

1.2. Historia badań nad antytrypsyną

Historia badań nad antytrypsyną rozpoczęła się ponad czterdzieści lat temu. Wczesne lata 60. ubiegłego stulecia w Szwecji, to intensywny rozwój technik elektroforetycznych oraz przesunięcie zainteresowania wśród pulmonologów z problemów związanych z gruźlicą na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP). Do centralnego laboratorium diagnostyki białek surowicy w Malmö wysyłano próbki od pacjentów z rozedmą, spodziewając się u nich pewnych zaburzeń w obrazie elektroforetycznym immunoglobulin (1). Nie zaobserwowano takiego związku, natomiast kierownik zespołu, biochemik Carl-Bertil Laurell, zwrócił uwagę, że u części tych osób występuje brak prążka α_1 w obrazie elektroforetycznym (2). Wraz z klinicystą Stenem Erikssonem stwierdzili, że brakująca frakcja to glikoproteina wyizolowana w 1962 roku przez badaczy w Behring Werke (Magdeburg, Niemcy), którą ze względu na zdolność inhibicji trypsyny nazwano antytrypsyną (3).

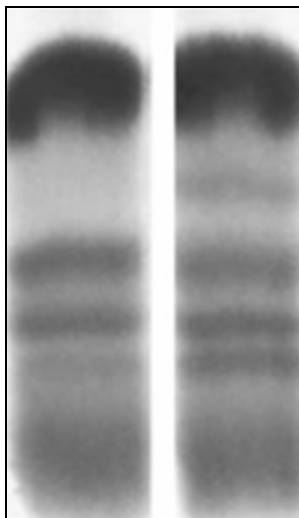
W 1963 roku Laurell i Eriksson opisali pięć takich przypadków (spośród których u 3 występowała POChP) stwierdzając, że istnieje związek pomiędzy rozedmą a niedoborem AAT (4).

Rycina 1.
Carl-Bertil Laurell (1919-2001) [Za: (2)].



Podejrzenia te zostały potwierdzone w dalszych badaniach: zdolność hamowania trypsyny przez surowicę była związana głównie (w 90%) z frakcją α_1 , natomiast u pacjentów z niedoborem obniżona była do 10-20% wartości prawidłowych. Analiza rodowodów osób z niedoborami wykazała, że u części członków występuje normalne stężenie AAT w surowicy, natomiast u pozostałych jest obniżone do 60 (heterozygoty) lub 10% (homozygoty zmutowane) wartości prawidłowych, sugerując wrodzony, autosomalny sposób dziedziczenia tego schorzenia. Polimorfizm inhibitora proteaz – Pi (*protease inhibitor*) został opisany w 1967 roku przez Magne Fagerhöl z Norwegii i Laurell’a, a także Diane Cox z Kanady. Na podstawie ogniskowania izoelektrycznego białka w żelach skrobiowych wprowadzono odpowiednie nazewnictwo (5). Kueppers i Bearn wykazali zdolność AAT do inhibicji proteaz uwalnianych z ludzkich leukocytów (6), dwa lata później Janoff i Schrerer (7) odkryli elastazę neutrofilową, a Olsson wykazał jej wysokie powinowactwo do AAT (8). Kolejne eksperymenty potwierdziły kluczową rolę elastazy neutrofilowej w rozwoju rozedmy. W 1978 roku Larsson wykazał niezaprzeczalny wpływ palenia tytoniu na rozwój rozedmy u osób z niedoborem AAT (9). Natomiast związek z występowaniem schorzeń wątroby został dopiero udokumentowany w 1969 roku przez Harvey’a Skarpa, pediatrę ze Stanów Zjednoczonych (10).

Rycina 2.
Obraz elektroforetyczny białek surowicy osoby z ciężkim niedoborem AAT (brak prążka α_1) i prawidłowy (po prawej) [Za: (2)].



W roku 1971 Szczeklik opisał pierwszy przypadek występowania niedoboru AAT w Polsce (11), jego dalsze prace dostarczyły dowodów, że u osób z częściowym niedoborem pracujących w warunkach dużego zapylenia przemysłowego wcześniej dochodzi do rozwoju rozedmy (12), dokonał on także opisu wariantów AAT w astmie oskrzelowej (13;14).

1.3. *SERPINY- rodzina inhibitorów proteaz serynowych*

Alfa₁-antytrypsyna należy do rodziny serpin – inhibitorów proteaz serynowych (*serine protease inhibitors*). Białka te występują u roślin, grzybów, zwierząt, a także niektórych bakterii i wirusów. Serpiny są bardzo podobne w obrębie struktury III-rzędowej, ale różnią się funkcjami, do których należy m.in. regulowanie procesów zapalnych, odpowiedzi układu dopełniacza, krzepnięcia i fibrynolizy (alfa₁-antychymotrypsyna, antytrombina III, oraz inhibitor-1 aktywatora plazminogenu). Część białek z tej rodziny utraciła funkcję inhibitora proteaz i służy do transportu hormonów (globulina wiążąca tyroksynę czy kortykosteroidy) lub regulacji ciśnienia krwi (angiotensynogen).

Tabela 1.

Proteazy serynowe, odpowiadające im inhibitory – serpiny oraz przykłady serpinopatii.

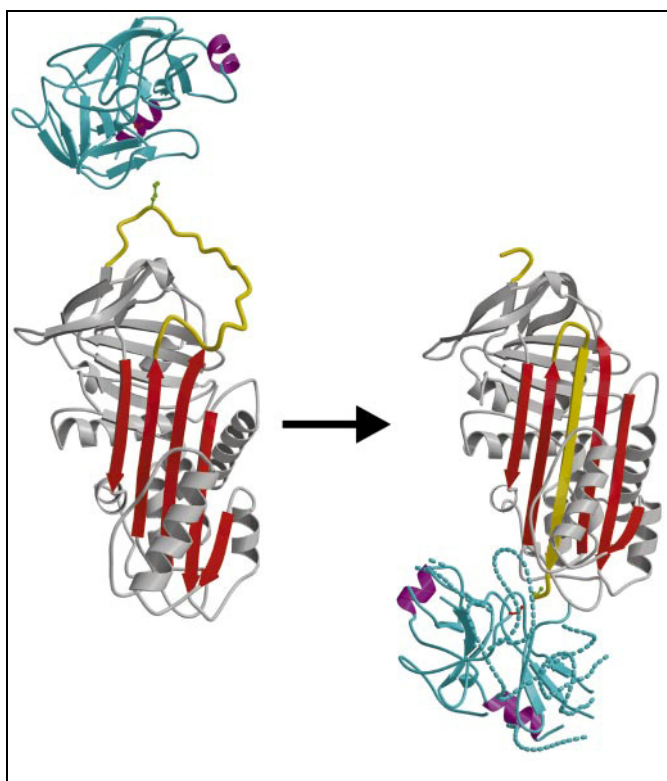
Proteaza serynowa	Serpina	Serpinopatia Choroba konformacyjna
Chymotrypsyna	Alfa ₁ -antychymotrypsyna	Brak hamowania: rozedma
Składowa dopełniacza C1	C1 inhibitor (C1INH)	Brak hamowania: wrodzony obrzęk naczynioruchowy
Elastaza	Alfa ₁ -antytrypsyna	Brak hamowania: rozedma, Akumulacja: marskość wątroby
Plazmina	Alfa ₂ -antyplazmina	Brak hamowania: krwawienia
Trombina, czynnik Xa	Antytrombina III	Brak hamowania: zakrzepica

Serpiny składają się z trzech β -harmonijek (A-C) oraz co najmniej 7 α -helis (zazwyczaj 9, od A do I). Natywne serpiny występują w metastabilnej, „napiętej” konformacji. Pętla reaktywna (*reactive site loop*, *reactive center loop*) jest ruchomym łańcuchem około 17 reszt aminokwasowych, rozciągniętym pomiędzy harmonijką A a C. Znajduje się tam miejsce aktywne, rozpoznawane przez docelową proteazę. Pętla ta może ulegać insercji w środek β -harmonijki A, dając nieaktywną formę latentną serpiny, która może odzyskać funkcję po denaturacji i ponownym fałdowaniu. Najbardziej stabilną jest konformacją, kiedy pętla ulega przecięciu przez proteazę i pełnemu wstawieniu w strukturę β -harmonijki A (15;16).

Działanie serpin opiera się na mechanizmie kinetycznej pułapki; serpina jako „samobójczy wabik” prezentuje centrum pętli reaktywnej, które zostaje rozpoznawane przez proteinazę jako substrat do proteolizy. W pierwszym etapie dochodzi do wytworzenia początkowego niekowalencyjnego kompleksu Michaelisa, a następnie ataku miejsca katalitycznego proteazy (Ser¹⁹⁵) i przecięcia wiązania peptydowego P1'-P1 pętli reaktywnej serpiny. Prowadzi do utworzenia przejściowego kompleksu serpina-proteaza połączonych kowalencyjnym wiązaniem acylowym, uwolnieniem nowego końca aminowego miejsca P1' i ostatecznie powstania wiązania estrowego P1 i proteaza. Przerwanie wiązania P1'-P1 wywołuje dramatyczną zmianę konformacyjną serpiny i włączenie swobodnej pętli reaktywnej P1 jako czwartego łańcucha w strukturę β -harmonijki A serpiny, wraz z translokacją o 70 Å związanej proteazy na drugi biegun cząsteczki serpiny. Utworzony kompleks

serpina – proteaza jest stabilny tygodniami lub latami, w zależności od warunków. Inhibicja proteazy wynika z konformacyjnego przemieszczenia i utworzenia hiperstabilnej serpiny oraz zdeformowanej proteazy, gdzie miejsce aktywnej seryny zostaje zmienione przestrzennie. Po translokacji, serpina może indukować wrażliwość na proteolizę inhibowanej proteazy, co prowadzi do trwałego uszkodzenia jej zdolności katalitycznych. Jeżeli jednak proces insercji pętli nie jest dość szybki, proteaza serynowa może zakończyć procesu deacylacji i odłączyć się z kompleksu (*noninhibitory pathway*) prowadząc do powstania strawionej serpiny i natywnej proteazy (17-19). Mechanizm prawidłowej inhibicji wymaga odpowiedniej długości pętli reaktywnej (usunięcie jednego lub dwóch reszt aminokwasowych zmniejsza zdolność do inhibicji i zwiększa stabilność kompleksu, natomiast dodanie powoduje znaczne zmniejszenie stabilności kompleksu), oraz obecności w jej obrębie kompatybilnych reszt aminokwasowych zapewniających szybkie i prawidłowe włączenie w strukturę β -harmonijki (20).

Rycina 3.
Proces tworzenia kompleksu proteaza – serpina [Za: (19)].



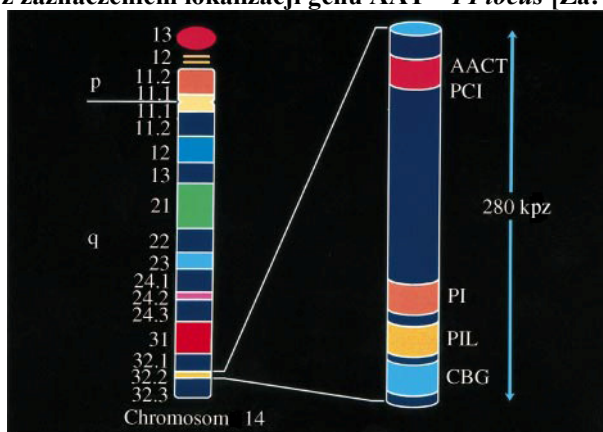
Na rycinie powyżej przedstawiono proces tworzenia kompleksu (po lewej) pomiędzy trypsyną (u góry), a AAT (poniżej) i następnie (po prawej) pełnego włączenia przeciętej pętli reaktywnej (na żółto) w strukturę β -harmonijki (na czerwono) serpiny, co wiąże się z translokacją proteazy. Na zielono zaznaczono metioninę 358 w pętli reaktywnej serpiny, rozpoznawana przez miejsce aktywne docelowej proteazy, gdzie występuje seryna 195 zaznaczona na czerwono.

Wspomniana metionina 358 jest kluczowa dla działania serpiny, jej oksydacja prowadzi do utraty zdolności hamowania proteaz. Drugim takim miejscem wrażliwym na oksydację jest metionina 351 (21). Oksydacja tych reszt aminokwasowych powoduje zmniejszenie zdolności wiązania z proteazą o ponad 2000 razy (22).

1.4. Gen PI – inhibitora proteaz

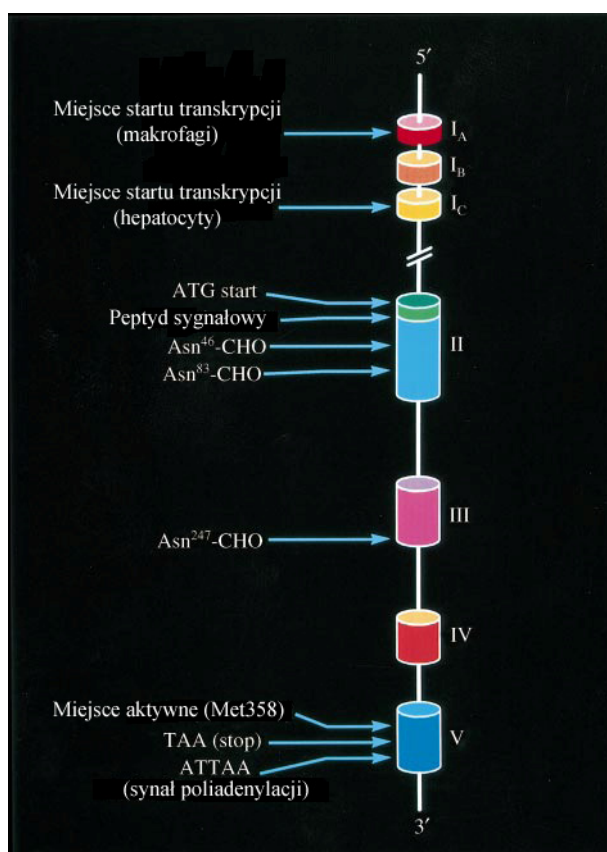
Locus genu AAT, oznaczanego jako PI (*Protease Inhibitor*), zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 14 (14q32.1), w grupie genów obejmujących globulinę wiążącą kortyzol (CBG), α_1 -chymotrypsynę (AACT), pseudogen AAT (PIL) oraz inhibitor białka C (PCI).

Rycina 4.
Chromosom 14 z zaznaczeniem lokalizacji genu AAT – PI locus [Za: (23); zmieniono].



Gen AAT składa się z 7 eksonów i 6 intronów obejmujących 12,2 kz. Posiada promotor specyficzny dla wątroby i alternatywne promotory dla innych tkanek, w których dochodzi do produkcji AAT. Podstawowa ekspresja białka w wątrobie jest regulowana przez synergistyczne działanie specyficznych dla tej tkanki czynników jądrowych: 1 α i 4. Wzmacniacz ekspresji (*enhancer*), modulowany przez cytokiny (interleukina-6), znajduje się 1,2 kz za ostatnim eksonem od końca 3' (24).

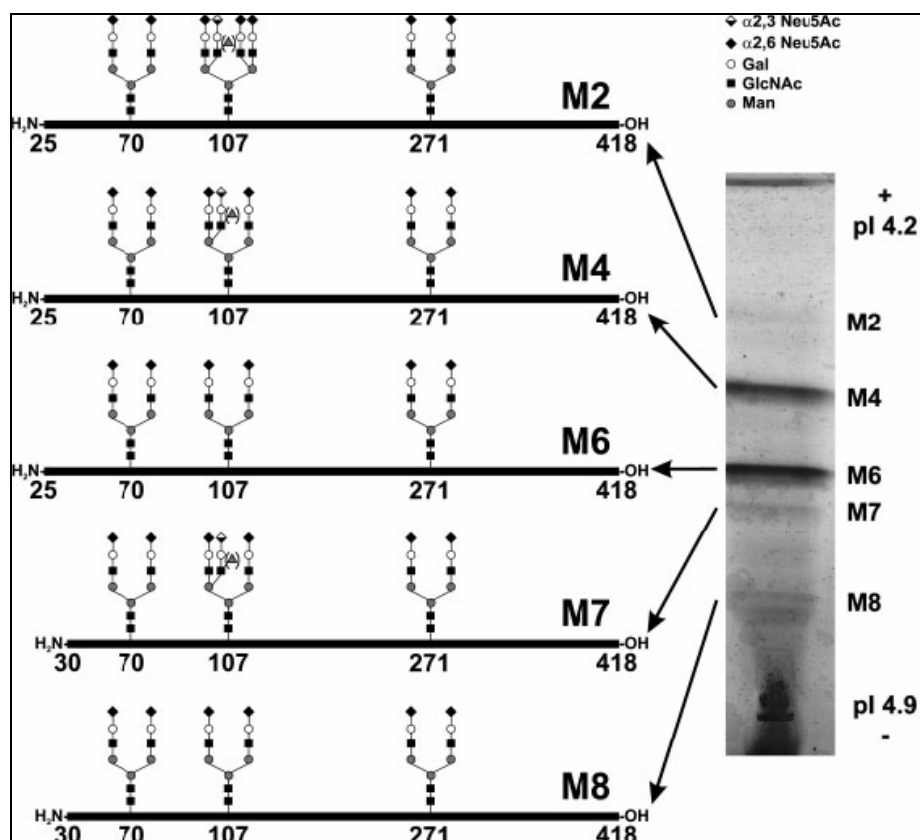
Rycina 5.
Organizacja genu AAT [Za: (23); zmieniono].



1.5. Budowa AAT

AAT jest glikoproteiną o masie molekularnej 52 kDa, składającą się z 394 aminokwasów i trzech bocznych łańcuchów węglowodanowych, poprzez azot związanych z resztami asparaginy (Asn^{46} , Asn^{83} , Asn^{247}). Translacja mRNA daje białko o długości 418 aminokwasów, obejmując 24 aminokwasowy peptyd sygnałowy. W retikulum endoplazmatycznym (ER) peptyd sygnałowy jest odcinany i dołączane są bogate w mannozę łańcuchy węglowodanowe, a następnie białko przenoszone jest do aparatu Golgiego, gdzie łańcuchy boczne ulegają przycięciu. Węglowodany stanowią ok. 12% cząsteczki, przy czym w dwóch miejscach glikozylacji mogą przyjmować formę tylko dwurozgałęzioną, natomiast w przypadku trzeciego: dwu-, trój- lub czterorozgałęzioną. Jest to przyczyna różnic w migracji cząsteczek białka i obecności kilku prążków w IEF (25;26).

Rycina 6.
Model glikoform AAT identyfikowanych za pomocą IEF [Za: (26)].

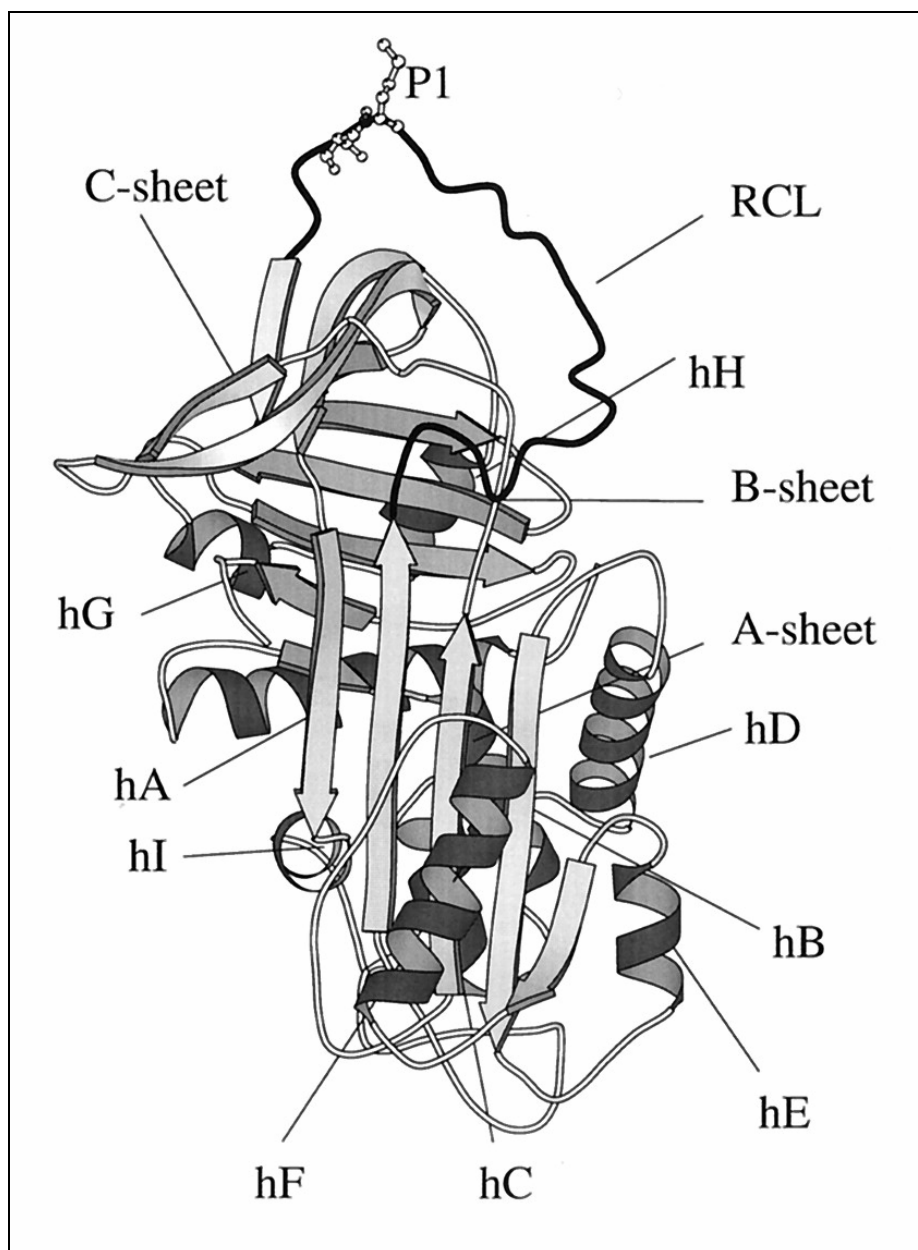


Nomenklatura aminokwasów zgodna z bazą Swiss-Pro (pozycja 70 odpowiada Asn⁴⁶, itd.), w pozycji 107 (Asn⁸³) N-glikany mogą przyjmować struktury o różnym rozgałęzieniu, prążki M7 i M8 odpowiadają pod kątem N-glikozylacji prążkom M4 i M6, ale ich N-końce są skrócone i rozpoczynają się w pozycji 30.

Cząsteczka AAT zbudowana jest z:

- Ruchomej pętli reaktywnej, z miejscem rozpoznawanym przez proteazę i następnie przez nią przecinanym: Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹;
- 3. β -harmonijek (A – składa się z 5 łańcuchów, B oraz C – 4 łańcuchy ściśle związane z A);
- 9. α -helis (A-I).

Rycina 7.
Schemat budowy natywnej cząsteczki AAT [Za: (27)].



RLC – ruchoma pętla reaktywna (*reactive center loop*), numerowana zgodnie z nomenklaturą: Pn...P2-P1-P1'-P2'...Pn', wiązanie peptydowe P1-P1', czyli Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹ jest przecinane przez proteazę; hA ... hI – α -helisy A-I; A-sheet ... C-sheet – β -harmonijki A-C.

Ruchome struktury AAT takie jak pętla reaktywna i β -harmonijka A, są krytyczne do działania serpiny, a jednocześnie uwrażliwiają białko na silny wpływ mutacji wpływających na proces jego fałdowania, co prowadzi do narażenia na proteolizę lub powstanie skłonności do polimeryzacji.

1.6. Warianty AAT

Dotychczas opisano blisko 120 wariantów AAT (28), opierając się przede wszystkim na wynikach fenotypowania białka, stąd poszczególne litery alfabetu od

A (dla najszybszych) do Z (dla najwolniejszych) przypisywane im były ze względu na szybkości migracji w czasie elektroforezy (np. M – *medium*, S – *slow*, Z – *very slow*, F – *fast*). Większość z nich występuje sporadycznie, jedynie sześć spotykana jest stosunkowo często. Są to cztery warianty prawidłowe: M1 – M4, oraz dwa warianty deficytowe Pi^*Z i Pi^*S . Na podstawie stężenia białka w surowicy i funkcji warianty te dzielą się na prawidłowe, niedoborowe, dysfunkcjonalne i typu *null*.

Dziedziczenie niedoborów odbywa się w sposób mendlowski, ciężkie niedobory występują u homozygot Z, oraz w przypadku współwystępowania allela Pi^*Z z mutacją typu *null*. O niedoborach częściowych (umiarkowanych) mówimy w przypadku innych kombinacji alleli (MZ, MS, SZ, SS).

1.6.1. Warianty prawidłowe

Są to warianty o prawidłowej funkcji i stężeniu białka w surowicy, występujące wśród 95% populacji. Do grupy tej należą (29):

- M1, z dwoma podtypami:
 - M1A (Ala^{213}) – najstarszy, z którego przez substytucje pojedynczych nukleotydów powstały kolejne warianty prawidłowe, występuje z częstością ok. 20-23% wśród rasy białej;
 - M1V ($\text{Ala}^{213}\text{Val}$) – występujący z częstością około 44-49%;
- M2 ($\text{Arg}^{101}\text{His}$) – powstały z M3, częstość występowania: 10-11%;
- M3 ($\text{Glu}^{376}\text{Asp}$) – powstały z M1V, o częstości 14-19%;
- M4 ($\text{Arg}^{101}\text{His}$) – powstały z M1V, stosunkowo najrzadszy.

1.6.2. Warianty niedoborowe

Warianty niedoborowe charakteryzują się prawidłową funkcją, natomiast obniżonym stężeniem białka. Najczęstsze i najlepiej scharakteryzowane to Pi^*S i Pi^*Z ; w obu przypadkach spowodowane są one substytucją pojedynczego nukleotydu.

1.6.2.1 Wariant S ($\text{Glu}^{264} \rightarrow \text{Val}$)

W przypadku tego wariantu dochodzi do transwersji $\text{GAA} \rightarrow \text{GTA}$ w eksonie 3 prowadzącej do substytucji kwasu glutaminowego w pozycji 264 na walinę. Stężenie białka w surowicy obniżone jest o 40%, nie występują natomiast typowe inkluzje

wątrobowe (jak w przypadku Pi*Z). Przypuszczalnie przyczyną niedoboru jest wzmożona degradacja wewnątrzkomórkowa białka. Spowodowane jest to najprawdopodobniej mniej stabilną strukturą III-rzędową tego wariantu, postuluje się także znacznie powolniejszą niż w przypadku wariantu Z polimeryzację białka, prowadzącą do kontrolowanej proteolizy nieprawidłowych cząsteczek (30;31).

1.6.2.2 Wariant Z (Glu³⁴²→Lys)

Wariant Pi*Z spowodowany jest tranzycją GAG→AAG w obrębie eksonu 5. Ta mutacja prowadzi do zamiany kwasu glutaminowego w pozycji 342 na lizynę. Nieprawidłowe białko w 90% polimeryzuje w obrębie hepatocytów, a stężenie w surowicy obniżone jest do 10% wartości prawidłowych. Wykazano także, że wariant Pi*Z charakteryzuje się słabszą zdolnością hamowania elastazy w porównaniu do prawidłowego białka Pi*M, czas potrzebny do inhibicji serpiny w przypadku cząsteczki zmutowanej jest dwukrotnie dłuższy. Zjawisko to może być związane z różnicami w sekwencji pomiędzy oboma wariantami (należy jednak mieć na uwadze, że mutacja Z nie dotyczy miejsca odpowiedzialnego za wiązanie z elastazą, tj. Met³⁵⁸; tak więc raczej odbywa się to przez zmianę struktury III-rzędowej), lub zaburzeniem modyfikacji białka, do której dochodzi po translacji mRNA (32).

1.6.2.3 Inne warianty niedoborowe

Do rzadszych wariantów niedoborowych należy S_{iiyama} (Ser⁵³→Phe) występujący w Japonii (33); czy M_{malton}, zwany także M_{nichinan} lub Mcagliari (delecja Phe⁵²) charakterystyczny dla Sardynii (34). W obu przypadkach obserwuje się podobne inkluzje wątrobowe jak przy występowaniu wariantu Pi*Z, białko polimeryzuje w mechanizmie pętla – β-harmonijka, choć proces ten jest bardziej nasilony, a jego stężenie w surowicy istotnie obniżone. Podobną, jak w przypadku Pi*S, umiarkowaną skłonność do polimeryzacji wykazuje natomiast wariant Pi*I (Arg³⁹→Cys) (31).

1.6.3. Warianty dysfunkcjonalne

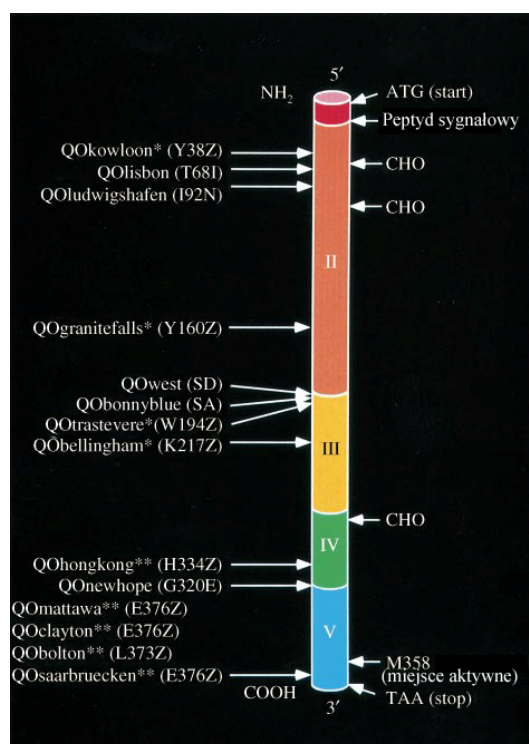
W przypadku tej grupy stężenie białka jest prawidłowe, natomiast zaburzona jest jego funkcja. W przypadku wariantu Pi*F (Arg²²³→Cys) zdolność wiązania z elastazą jest znacznie obniżona (35). Wariant Pittsburgh (Met³⁵⁸→Arg) charakteryzuje się utratą zdolności blokowania elastazy, natomiast nabyciem funkcji charakterystycznych dla antytrombiny III. Obie te serpiny powstały w wyniku

specjalizacji z jednego białka około 500 milionów lat temu. Zamiana krytycznej dla działania AAT metioniny w pętli reaktywnej na argininę (występującą w antytrombinie w obszarze rozpoznawanym przez docelową protezę) prowadzi do przejęcia przez AAT funkcji inhibicji trombiny i innych czynników krzepnięcia (np. czynnik Xa). Obecność inhibitora trombiny, niezależnego od heparyny, którego stężenie wzrasta kilkukrotnie w czasie reakcji typu „ostrej fazy” prowadzi do nasilonych krwawień związanych z urazami. (36).

1.6.4. Warianty typu *null*

Charakterystyczne w tym przypadku jest obniżenie stężenia białka w surowicy i rozwój objawów płucnych, bez konsekwencji ze strony wątroby. Warianty *null* są rzadkie i wynikają z różnych mechanizmów molekularnych, obejmujących duże delecje (bardzo rzadkie, np. QO_{isola di procida}), mutacje w intronach, mutacje nonsensowne, przesunięcia ramki i zmiany sensu, prowadzące do zamiany kodonów w krytycznych regionach. Obejmują one np. mutacje w miejscach splicingu RNA (np. QO_{west}, QO_{bonny}), tworzenie przedwczesnych kodonów terminujących (w przypadku II i III eksonu i prowadząc do braku wykrywalnego mRNA – QO_{granite falls}, QO_{bellingham}; lub w obszarze V eksonu i praktycznie prawidłowego poziomu mRNA – QO_{hong kong}, QO_{mattawa}, QO_{bolton}, QO_{clayton/saarbrucken}, oraz o pośrednim stężeniu mRNA – np. QO_{trastevere} – mutacja w III eksonie) (23;37).

Rycina 8.
Lokalizacja wariantów typu *null* [Za: (23); zmieniono].



1.7. Epidemiologia niedoborów AAT

Niedobory AAT są stosunkowo częste w europejskiej populacji, zaś homozygotyczność allele Z jest jedną z najczęstszych chorób genetycznych wśród rasy białej. Największa częstość allele PI*Z występuje w Europie północnej (Skandynawia), a obecny rozkład sugeruje rozprzestrzenienie się mutacji z północy w kierunku południa i zachodu Europy. Wariant Pi*S jest szczególnie częsty na Półwyspie Iberyjskim i najprawdopodobniej stamtąd wywodzi się ta mutacja. Następnie mutacje te migrowały po Europie zgodnie z ruchami ludnościowymi (38).

Analiza polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych w pobliżu *locus* globuliny wiążącej kortykosteroidy (CBG) wykazała że allele PI*Z powstał w wyniku pojedynczej mutacji około 66 generacji temu (2000 lat, przy założeniu, że jedna generacja to ok. 30 lat) (39). W kolejnych badaniach potwierdzono tą hipotezę datując narodziny PI*Z na około 6 840 lat temu (analiza haplotypów za pomocą RFLP) (40) i 4 070 – 3 210 lat temu za pomocą analizy mikrosatelit w obrębie *loci*: *Protease Inhibitor*-(TG)_n oraz *Protein C Inhibitor*-(TG)_n. Mutacja S jest starsza i datuje się jej powstanie na około 14 100 – 8 370 lat temu (41).

Największa częstość allele PI*S występuje w północno-zachodniej części Półwyspu Iberyjskiego (ok. 15%), w populacji hiszpańskiej i południowo-zachodniej Francji wartości te osiągają 10%. Częstość ta zmniejsza się do 7% na terenie Francji północnej, centralnej i zachodniej, a następnie do 4 – 5,5% w Wielkiej Brytanii i Belgii. Następnie częstość ta nadal stopniowo maleje do 2 – 4% we Włoszech, Niemczech, Danii, Estonii, Litwie, Holandii i południowej części Skandynawii. Niższe wartości, poniżej 2%, są notowane w północnej Skandynawii, Finlandii, Polsce, Serbii, Rosji i na Węgrzech.

Rozkład allele PI*Z w Europie jest przeciwny do zaprezentowanego powyżej. Publikowane wyniki nie są homogenne i różnią się w obrębie tych samych populacji, najprawdopodobniej ma to związek z doborem badanej próby. Niestety większość badań nie opiera się na próbach losowych z ogólnej populacji. Najwyższe częstości (4,5%) występują w zachodniej części Litwy (Kurlandia), gdzie migrowała ludność ze Szwecji. Wysokie częstości allele PI*Z (2,3 – 3,2%) są raportowane w północnej i zachodniej Szwecji, Estonii, także wśród wybranych populacji Duńczyków. Wartości rzędu 2,0 – 2,25% występują na części obszaru Francji (Normandia i Bretania), północnej Irlandii i południowej Anglii. Reszta Europy charakteryzuje się częstościami pomiędzy 2,0 a 0,5%. Najniższe wartości (<0,5%) raportowano na obszarze południowych Włoch, w Rosji oraz wśród wiejskiej populacji Danii. Allel ten nie występuje w populacji Basków i Lapończyków.

Rozkład częstości występowania homozygotyczności Z zmniejsza się z północnego-wschodu ($1/500 - 1/5\ 000$) w kierunku południowo-zachodnim ($1/1\ 000 - 1/90\ 000$).

Częstości heterozygot SZ osiąga wartości $1/200 - 1/1\ 000$ (Portugalia, Hiszpania, Francja, Anglia, Belgia, Dania, Szwecja, Łotwa i północne Włochy); $1/1\ 000 - 1/1\ 600$ (Holandia, Europa Centralna, północna Szwecja, Finlandia, Estonia, Litwa, oraz północne Włochy) do $1/8\ 000 - 1/9\ 000$ (Rosja) (42-44).

Poza Europą częstości alleli PI*S i PI*Z zależą od kolonizacji i napływu ludności europejskiej. W przypadku obszarów o niewielkim wpływie genetycznym z Europy (centralna i wschodnia Azja, Afryka, Aborygeni) allel PI*S jest bardzo rzadki lub wręcz nie występuje; natomiast praktycznie zerowe częstości wariantu PI*Z zanotowano w wschodnich Chinach, Korei, Japonii, Malezji, Jordanii i zachodniej Afryce. Wysokie wartości tego allele raportowano u Afgańczyków. W przypadku

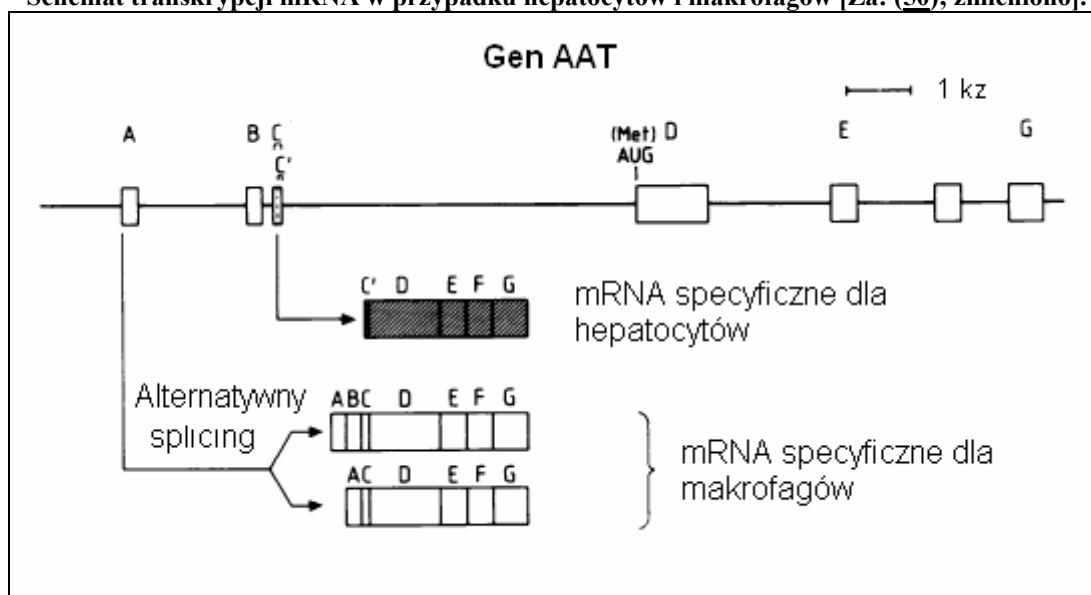
Japonii nie stwierdza się allele PI*S jak również PI*Z (podobnie jak u Chińczyków i Koreańczyków), występuje natomiast charakterystyczny dla tej populacji wariant M_{Siiyama} (45). Obszary o nasilonym wpływie genetycznym ludności europejskiej (Stany Zjednoczone Ameryki, Kanada, Australia, Nowa Zelandia) wykazują częstości zbliżone do europejskich, choć wyniki zależą od pochodzenia danej grupy etnicznej (46).

Łączne oszacowanie danych populacyjnych, w przeliczeniu na 4,4 miliarda mieszkańców Ziemi w 2002 roku, zaowocowało liczbą co najmniej 116 milionów nosicieli alleli deficytowych (MS, MZ) i 3,4 miliona osób narażonych na rozwój powikłań (SS, SZ, ZZ) (47;48). Przeliczając te dane na obecną populację 6,4 miliarda, można oczekiwać łącznie na świecie 170 milionów nosicieli i 4,9 miliona osób narażonych.

1.8. Wątrobowa i pozawątrobowa produkcja AAT

Głównym miejscem produkcji AAT w organizmie jest wątroba. Obwodowe stężenie AAT, jako białka ostrej fazy, wzrasta 3 – 4 krotnie w czasie ustrojowej reakcji zapalnej lub uszkodzenia tkanek. Poza wątrobą AAT jest produkowana przez monocyty krwi obwodowej, oraz makrofagi oskrzelowo-płucne i gruczołu piersiowego (49). W przypadku makrofagów miejsce promotorowe zlokalizowane jest ok. 2 kb powyżej miejsca charakterystycznego dla hepatocytów. W komórkach wątroby powstaje transkrypt o długości 1,4 kb ze zlokalizowaną od końca 5' sekwencją o długości 49 pb niepodlegającą translacji, pierwsze 45 nukleotydów stanowi krótki egzon oddzielony od następnego przez intron wielkości 5 kb. Powstające w fagocytach mRNA jest dłuższe od wątrobowego i istnieją dwie różne cząsteczki na skutek alternatywnego składania (*splicing*). Ekson A o długości 207 pb występuje w obu cząsteczkach makrofagowego mRNA, podobnie jak 101-nukleotydowy ekson C (częściowo pokrywający się z pierwszym eksonem mRNA w hepatocytach). Dodatkowo w niektórych cząsteczkach mRNA występuje obejmujący 209 nukleotydów ekson B. W wszystkich przypadkach powstaje to samo białko, choć w makrofagach w przypadku dłuższych cząsteczek mRNA istnieją dodatkowo dwie krótkie ramki odczytu, pierwsza rozpoczynająca się i kończąca w obrębie eksonu B, druga rozpoczynająca się pod koniec egzonu B i kończąca w ostatnim specyficznym dla makrofagów egzonie C i nakładająca się na wątrobowy ekson C' (50).

Rycina 9.
Schemat transkrypcji mRNA w przypadku hepatocytów i makrofagów [Za: (50); zmieniono].



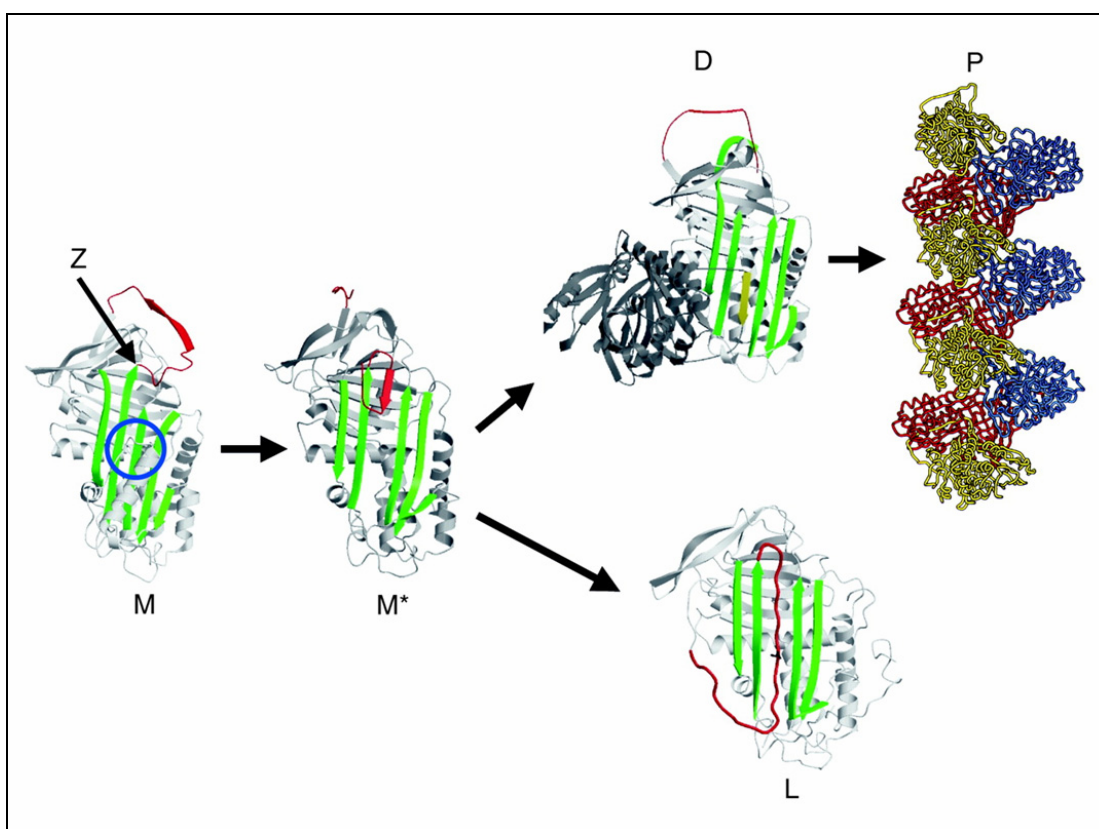
Regulacja tego procesu w hepatocytach i fagocytach jednojądrzastych odbywa się poprzez interleukiny 2 β i 6. Ich wpływ na ekspresję genu AAT jest pretranslacyjny, prowadząc do zwiększenia poziomu mRNA, natomiast nie wpływa na kinetykę wydzielania białka (51). Dwukrotnie silniej zwiększa produkcję AAT w tych komórkach LPS, wywierając bezpośredni wpływ na wzmożenie translacji białka (52). W makrofagach regulacja produkcji AAT ma także charakter specyficzny dla tkanki, jej synteza jest bowiem potęgowana, obok LPS-u, przez elastazę neutrofilową (także trzustkową). Działanie elastazy jest szybsze niż LPS-u, odbywa się poprzez regulację pretranslacyjną i wzrost poziomu mRNA; w tym przypadku wymagana jest obecność aktywnej enzymatycznie proteazy serynowej i AAT, a także, być może utworzenia kompleksu proteaza-antyproteaza (53). Działania regulującego nie wykazują natomiast Il-1 β , TNF α ; regulujące ekspresję innych białek ostrej fazy (54); a także IFN γ i steroidy. AAT jest produkowana także na powierzchni nabłonkowej płuc, najprawdopodobniej przez komórki nabłonka, albo makrofagi. W przypadku produkcji przez komórki wywodzące się z nabłonka płuc, produkcja AAT pobudzana jest przez interleukinę-1, deksametazon i onkostatynę M, a nie przez interleukinę-6, ponadto powstające białko różni się wzorem glikozylacji; w przypadku wątroby występują trzy formy glikozylacji, natomiast w komórkach nabłonka płuc tylko jedna, co może sugerować odmienny mechanizm wychwytu AAT pochodzącej z płucnej produkcji, jako że czas życia białka produkowanego w wątrobie przynajmniej częściowo zależy od liczby i rodzaju bocznych łańcuchów węglowodanowych (55). Wykazano również produkcję antytrypsyny przez komórki

nabłonka jelit, gdzie wielkość powstającego mRNA jest mniejsza niż w przypadku monocytów i makrofagów (56).

1.9. Patofizjologia niedoborów AAT i objawy kliniczne

Choroby konformacyjne obejmują dużą grupę różnorodnych schorzeń wywoływanych wrodzonym lub nabytym zaburzeniem fałdowania białek i ich agregacją. Zaliczamy tu chorobę Alzheimera, Parkinsona, amyloidozy, choroby prionowe, itd. Sztandarowym przykładem jest niedobór AAT, a dokładniej niektóre warianty tego białka wykazujące skłonność do polimeryzacji (57;58).

Rycina 10.
Mutacja Z i polimeryzacja cząsteczek AAT [Za: (60)].



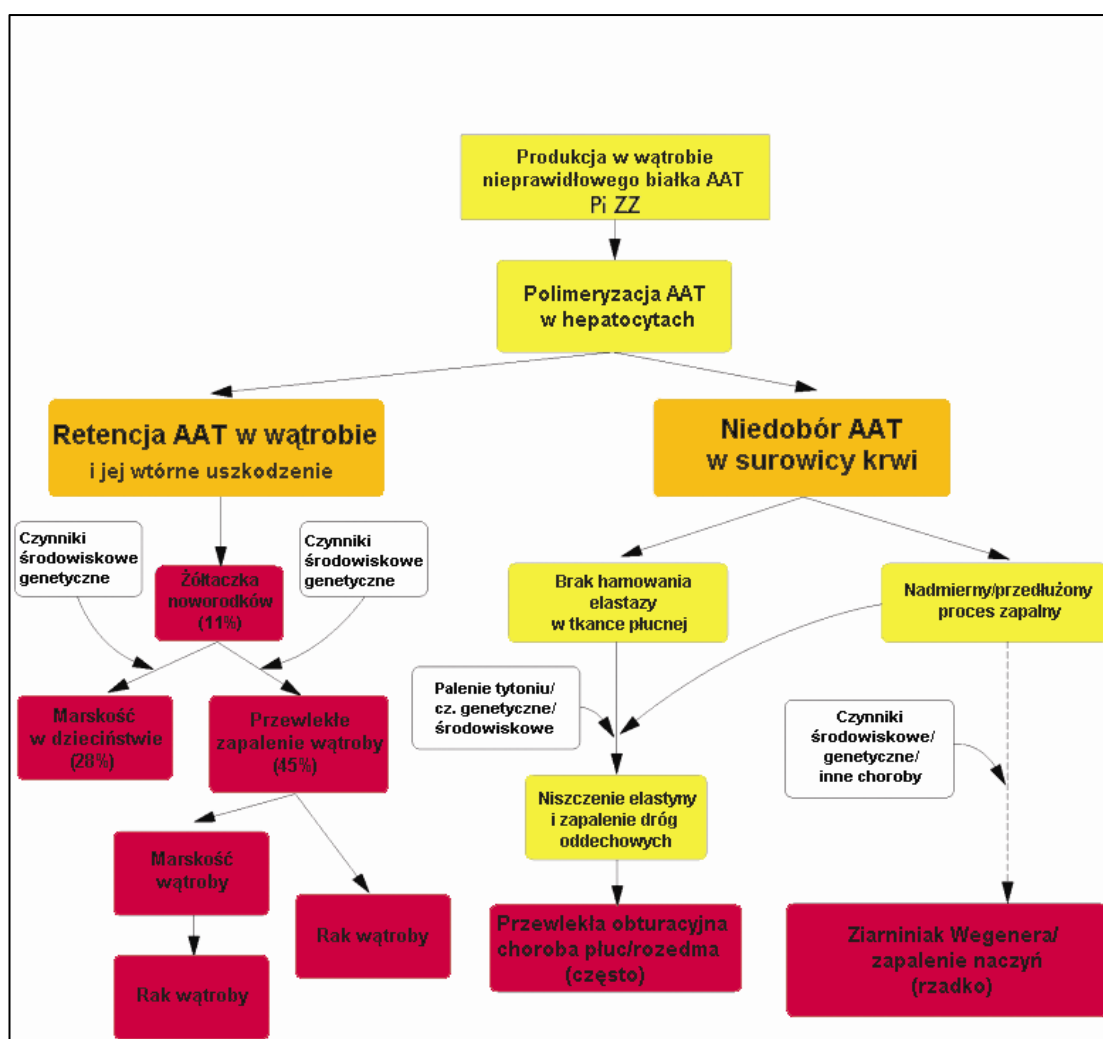
W obrębie cząsteczki AAT na zielono zaznaczono β -harmonijkę A, natomiast na czerwono ruchomą pętlę reaktywną. Skłonność do polimeryzacji wynika z obecności mutacji Z (strzałka) lub innych otwierających strukturę β -harmonijki A (niebieski okrąg). Prowadzi to do powstania przejściowej formy niestabilnej (M^*) z częściową insercją ruchomej pętli reaktywnej. Włączenie pętli innej cząsteczki prowadzi do powstania dimerów (D) a następnie polimerów (P), natomiast gdy proces odbywa się w obrębie jednej cząsteczki powstaje forma latentna (L).

Najlepiej poznanym allelem niedoborowym jest PI^*Z . Mutacja punktowa Z prowadzi do zmiany reszty aminokwasowej P17 (17 miejsc proksymalnie do P1), w głowie 5 łańcucha β -harmonijki A, na podstawie ruchomej pętli reaktywnej. Ta zmiana otwiera β -harmonijkę A dając pośrednią, niestabilną formę M^* . Samoistne

włączenie pętli reaktywnej w kolejną cząsteczkę AAT prowadzi do powstania dimeru, a następnie polimerów w mechanizmie pętla – β -harmonijka. Pętla reaktywna w obrębie jednej cząsteczki może także ulegać włączeniu w strukturę β -harmonijki dając formę latentną (59;60).

W przypadku niedoborów AAT wywołanych obecnością wariantu Pi*Z większość powstającego białka ulega polimeryzacji w hepatocytach, uszkadzając je i dają różne objawy wątrobowe (od przedłużonej żółtaczki noworodków, po marskość i raka wątroby). Obniżone stężenie w krwioobiegu prowadzi do zachwiania równowagi proteazy-antyproteazy, głównie w tkance płucnej, objawiające się rozedmą i przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) o wczesnym początku. Wykazano także związek niedoborów z przypadkami zapaleń naczyń, głównie ziarniniakiem Wegnera oraz zapaleniami tkanki podskórnej.

Rycina 11.
Patomechanizm niedoborów AAT.

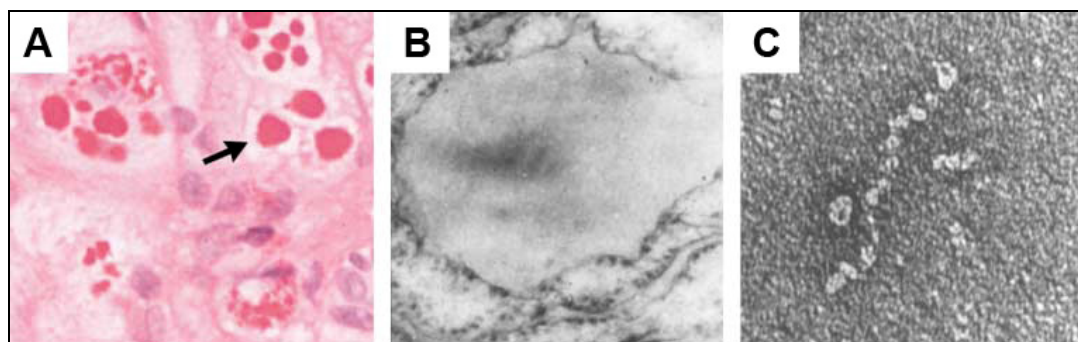


1.9.1. Akumulacja białka w hepatocytach i objawy wątrobowe

1.9.1.1 Patomechanizm uszkodzenia wątroby

Uszkodzenie wątroby tłumaczone jest teorią akumulacji. Wariant Pi*Z jest produkowany normalnie w hepatocytach, ale 80 – 90% białka zamiast ulegać sekrecji, polimeryzuje w obrębie szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (ER) prowadząc u części pacjentów do uszkodzenia wątroby. Powstawanie złogów AAT wzrasta wraz z temperaturą (zwiększenie skłonności do polimeryzacji) lub w przypadku odpowiedzi typu „ostrej fazy” (zwiększona produkcja AAT) (61). Złogi te widoczne są w materiale wątrobowym, jako PAS-dodatnie (*periodic acid Schiff-positive*), odporne na diastazę (amylazę) inkluzje wewnątrzkomórkowe.

Rycina 12.
Inkluzje AAT w obrębie hepatocytów [Za: (58)].



A – barwienie PAS, strzałka wskazuje wewnątrzkomórkowe inkluzje (pow. 200x); B – obraz z mikroskopu elektronowego, w obrębie szorstkiego retikulum endoplazmatycznego obecna akumulacja AAT (20 000x); C – inkluzje AAT tworzone przez polimeryzujące cząsteczki zmutowanego białka przypominają paciorki (pow. 220 000x).

Obecność polimerów, obładowujących ER jest główną przyczyną uszkodzenia komórek wątroby. Niektóre dane sugerują, że polimeryzacja AAT nie jest główną przyczyną retencji w obrębie ER, ale raczej jej wynikiem. Przemawiają za tym obserwacje dotyczące rzadkiego wariantu QO_{Saarbruecken} (przedwczesny kodonu terminujący powodujący skrócenie końca karboksylowego białka o 19 aminokwasów), a także wariantu Pi*Z + QO_{Saarbruecken} (niosącego obie mutacje), w przypadku których dochodzi do przedłużonej retencji w obrębie ER bez skłonności do polimeryzacji (62). Ponadto tylko nieznaczna część cząsteczek Pi*ZZ (około 15%) wewnątrzkomórkowo trwale występuje w formie polimerów.

Z punktu klinicznego niezwykle istotne jest, że tylko 10 – 15% homozygot Z rozwija objawy wątrobowe. Istnieją zatem inne czynniki genetyczne lub środowiskowe wpływają na efektywność procesu usuwania polimerów AAT.

Udowodniono, że rekombinowane fibroblasty osób z ciężkim niedoborem i chorobą wątroby (*susceptible hosts*) wykazują znacznie słabszą degradację polimeryzujących cząsteczek AAT w porównaniu do osób z niedoborem, a bez objawów wątrobowych (*protected hosts*) (63).

W ochronnej degradacji akumulującego białka uczestniczy system proteosomów, obejmujący zarówno klasyczny mechanizm (wiązanie z kalneksyną, błonowym „chaperonem” – białkiem opiekuńczym; następnie poliubikwitynacja kalneksyny i proteoliza kompleksu przez proteosom 26S) jak i niezależny od ubikwityny (64). Nie wyjaśniono ostatecznie, jak dochodzi do przeniesienia polimerów ze światła ER do cytoplazmy, być może jest to wsteczna translokacja lub przenoszenie AAT przez błonę ER mediowane przez proteosom. Obecnie, coraz mocniej akcentuje się niezależny od proteosomów mechanizm autofagocytozy, jako odgrywający istotną rolę w degradacji AAT (65;66). Autofagia jest mechanizmem trawienia przez komórkę elementów cytozolu lub organelli, takich jak mitochondria lub część ER, które początkowo zostają otoczone przez podwójną błonę endoplazmatyczną (najprawdopodobniej pochodzącą z aparatu Golgiego), następnie pęcherzyk z zawartością ulega połączeniu z lizosomem i ulega strawieniu.

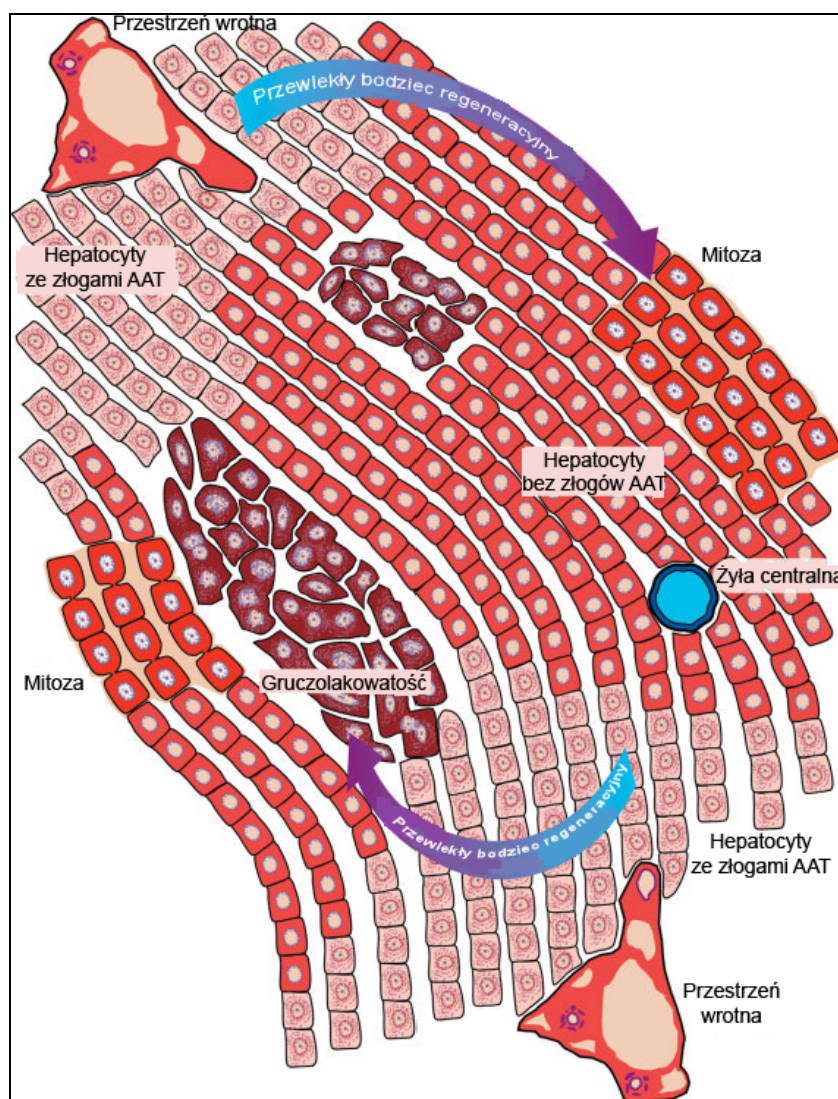
Proces autofagii z jednej strony chroni komórkę przed gromadzącymi się złogami AAT, a z drugiej wiąże się ze zwiększeniem uszkodzenia mitochondriów w hepatocytach. Proces ten może być bezpośrednio spowodowany obciążeniem ER lub też nadmierną skłonnością do niespecyficznej autofagii, obejmującej także prawidłowe organelle. Ten mechanizm, a także aktywacja kaspazy-3 wydają się być kluczowe w uszkodzeniu hepatocytów (67;68). Obładowanie ER aktywuje także czynnik jądrowy κ B (NF κ B), który poprzez interleukinę-8 może powodować proces neutrofilowego zapalenia. Spośród innych szlaków sygnałowych aktywowanych akumulującymi cząsteczkami AAT można wymienić kaspazę-12 i 4, a także BAP31 – białko błonowe związane z proapoptotycznym sygnałem z ER do mitochondriów (69).

Wątroba homozygot narażona jest nie tylko na uszkodzenie, prowadzące często do marskości, ale także nowotworzenie i częściowo, być może, są to niezależne mechanizmy. Ryzyko rozwoju raka wątrobowokomórkowego jest wyższe niż wynikałoby tylko z obecności marskości, wykazano także obecność raka u pacjentów

z ciężkim niedoborem, a tylko nieznacznymi cechami włóknienia lub marskości, lub nawet bez tych zmian.

Proponowany model nowotworzenia w obrębie wątroby homozygot Z zakłada, że akumulacja AAT aktywuje kaspazy, NFκB i proces autofagii, ale szlak kaspaz jest zablokowany na końcowym etapie, tak, że komórki zawierające złogi są chore, ale nie martwe (*sick but not dead*). Wysyłają on stały sygnał regeneracji, proporcjonalnie do obciążenia polimeryzującym białkiem danej komórki i ilości chorych komórek. Hepatocyty z mniejszą ilością polimerów (bez złogów AAT) są przewlekłe stymulowane do podziałów co zwiększa prawdopodobieństwo złośliwej transformacji. Gruczolaki i raki powstają w obszarach z komórkami bez złogów AAT. Nie jest jasne dlaczego szlak kaspazy jest zablokowany w hepatocytach zawierających złogi AAT, być może jest to antyapoptotyczne działanie białek „ostrej fazy” (69). Wykazano bowiem, że u osób o genotypie PI*ZZ z chorobą wątroby, indukcja białek hepatocytów charakterystyczna dla odpowiedzi typu „ostrej fazy” (SP90, SP70, ubikwityna) występuje nawet w przypadku braku dodatkowych czynników termicznych lub chemicznych. Jest ona specyficzna dla tej podgrupy pacjentów, nie dotyczy natomiast bezobjawowych homozygot Z, lub nosicieli allela S, jak również homozygot M z prawidłowym genotypem i ciężkimi schorzeniami wątroby. Prawdopodobnie wywoływana jest ona przez gromadzące się w hepatocytach nieprawidłowe białko AAT (70).

Rycina 13.
Model karcinogenezy w wątrobie osób z ciężkim niedoborem AAT [Za: (69); zmieniono].



Komórki wątroby obciążone złogami AAT (różowy) występują głównie w okolicy przestrzeni wrotnych, ulegają uszkodzeniu przez polimeryzujące białko i wysyłają przewlekły bodziec regeneracyjny który odbierają hepatocyty niezawierające widocznych złogów (czerwony). Prowadzi to do wzmożonej proliferacji w centrum zrazików (obszary jasno czerwone) i rakowacenia (ciemnoczerwony).

1.9.1.2 Objawy wątrobowe

Objawy wątrobowe związane z niedoborem występują głównie w dwóch okresach życia: wczesnego dzieciństwa i w wieku powyżej 50 rż. W dzieciństwie ponad połowa homozygot Z wykazuje nieprawidłowe testy wątrobowe (umiarkowane podniesione stężenia bilirubiny niezwiązanej i enzymów wątrobowych), najczęściej bez innych objawów, utrzymujące się przez lata. Tylko u ok. 10% uszkodzenie wątroby daje objawy kliniczne, najczęściej jest to przedłużona żółtaczką (do 1 – 2 miesiąca) lub hepatomegalia. Z drugiej strony fenotyp ZZ może być przyczyną krańcowej niewydolności wątroby wymagającej przeszczepu (ciężki

niedobór AAT jest najczęstszą przyczyną przeszczepów wątroby u dzieci). Ciężka niewydolność wątroby jest na szczęście rzadkim powikłaniem, dając jednak bardzo poważne objawy dotyczące zaburzeń krzepnięcia (niedobór witaminy K), takie jak: krwawienia z przewodu pokarmowego, kikuta pępkowego, siniaki, czy, rzadko, krwawienia do CSN. Jeszcze rzadsze są: postępująca hepatosplenomegalia, wodobrzusze i piorunująca niewydolność wątroby. Ten szczyt zachorowalności w okresie noworodkowym być może jest związany z niedojrzałością hepatocytów, czynnikami ryzyka, usposabiającymi do rozwoju objawów, mogą być infekcje i stany gorączkowe zwiększające produkcję AAT.

W wieku dorosłym marskość może wystąpić w każdym wieku. Badania populacyjne wykazują, że homozygotyczność Z zwiększa 20-krotnie ryzyko rozwoju przewlekłej choroby wątroby. Marskość osiąga wyższe częstości (powyżej 15%) u starszych osób, w wieku powyżej 50 lat, dotychczas niepalących, u których nie doszło do rozwoju nasilonej rozedmy i POChP, stanowiącej przyczynę przedwczesnego zgonu. Z tego powodu średni wiek zgonu osób ZZ rozwijających marskość jest wyższa niż tych bez marskości. Objawy kliniczne i laboratoryjne są identyczne jak w przypadku marskości o innej etiologii. Jedna trzecia starszych pacjentów umiera z powodu powikłań nadciśnienia wrotnego i raka wątroby. Prognoza jest zazwyczaj poważna, średnie przeżycie wynosi 2 lata po diagnozie. Ryzyko rozwoju pierwotnego raka wątroby jest znacznie zwiększone u homozygot Z, u heterozygot jest niewielkie (71).

Jedynym znanym czynnikiem ryzyka związanym z rozwojem marskości u homozygot Z jest płeć męska. Takie czynniki jak zakażenia wirusowe, zwłaszcza HCV, czy toksyczne uszkodzenie wątroby przez alkohol wydają się być kluczowe w rozwoju schorzenia u heterozygot. Wariant S również wykazuje tendencję do akumulacji w wątrobie, ale proces ten jest znacznie mniej nasilony, przez co najprawdopodobniej nie stwarza zagrożenia nawet u osób podatnych. (71-74)}.

1.9.2. Zaburzenie równowagi proteazy-antyproteazy i objawy płucne

1.9.2.1 Patomechanizm uszkodzenia płuc

Uszkodzenie płuc w przypadku niedoborów AAT tłumaczone jest zaburzeniem równowagi elastaza-antyelastaza. Elastaza składowana jest jako aktywny enzym w

ziarnistościach azurofilnych neutrofilów, razem z proteinazą-3 i katepsyną G. Jest proteazą o szerokiej specyficzności, degradującą czynniki podlegające fagocytozie i zewnątrzkomórkowe. Obok AAT w tkance płucnej są także obecne inne inhibitory proteaz: serpiny – inhibitor monocytarnej/neutrofilowej elastazy (MNEI), blokujący 3 wymienione proteazy, uwalniany przez neutrofile i makrofagi (75); antychymotrypsyna, bardziej specyficzna względem katepsyny G; chelonianiny – antyleukoproteaza (SLPI – *secretory leukocyte protease inhibitor* lub HUSI – *human seminal protease inhibitor*), wydzielana przez komórki śluzówki drzewa oskrzelowego, szyjki macicy, ślinianek, obecna także w nasieniu; oraz elafina, występująca w skórze. W niewielkich ilościach może być także obecna alfa₂-makroglobulina. Spośród 3 proteaz serynowych uwalnianych z ziarnistości pierwotnych neutrofilów, elastaza jest preferowanym substratem dla AAT w reakcji hamowania, blokowanie proteinazy 3 i katepsyny G odbywa się dopiero po zablokowaniu wolnej elastazy (76).

AAT jest głównym składnikiem ochrony przed elastazą w przestrzeni pęcherzykowej. Docierając tam z krążenia obwodowego lub powstaje w wyniku lokalnej produkcji. W przypadku alleli deficytowych, a także alleli typu *null* (gdy nie stwierdza się krążącej antytrypsyny) obniżone stężenie AAT powoduje przesunięcie równowagi w kierunku elastazy i niszczenia elastyny tworzącej zrąb płuca i innych zewnątrzkomórkowych składników macierzy.

Niemniej badania na dużych populacjach wskazują, że jedynie u 60% osób z ciężkim niedoborem AAT dochodzi do rozwoju nasilonej rozedmy, zatem sam niedobór AAT nie jest wystarczającym czynnikiem do rozwoju rozedmy, wymagane są także inne komponenty prowadzące do wzmożenia reakcji zapalnej pobudzającej neutrofile, lub uszkadzającej mechanizmy naprawcze (71).

Głównym takim czynnikiem jest dym tytoniowy, którego czynniki utleniające (oksydanty) inaktywują AAT (przez zmianę metioniny 358 na sulfotlenek metioniny). Dym tytoniowy (podobnie jak proteaza) może również obniżać produkcję elastyny, dodatkowo pobudza reakcję zapalną, być może przez uwalnianie czynników chemotaktycznych dla neutrofilów przez makrofagi (głównie leukotrienu B₄). Pobudzone makrofagi i neutrofile wydzielają inne metaloproteiny, degradujące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, a także mogące przez

ograniczoną proteolizę blisko miejsca aktywnego (Phe³⁵²-Leu³⁵³ i Pro³⁵⁷-Met³⁵⁸) inaktywować AAT (77).

Ponadto cząsteczki Pi*Z wykazują się słabszą zdolnością hamowania elastazy, a także mogą ulegać polimeryzacji w tkance płucnej, co prowadzi do dalszego obniżenia stężenia AAT. Zjawisko to może być nasilane przez współistniejący proces zapalny lub dym tytoniowy, prowadzące do obniżenia pH. Polimery AAT są obecne w płucach osób z ciężkim niedoborem (78), nie wykazując funkcji hamującej elastazę, a raczej działanie prozapalne (79), stanowiąc silny chemoatraktant dla neutrofili (80), podobnie jak kompleksy antytrypsyna-elastaza (81). Polimery AAT pobudzają nie tylko ruch neutrofili (chemokinezę), ale także ukierunkowaną migrację (chemotaksję), oraz polaryzację komórek i uwalnianie mieloperoksydazy (82), która może także utleniać AAT i hamować jej funkcję (83).

W popłuczynach oskrzelikowi-pęcherzykowych osób z ciężkim niedoborem stwierdza się trzykrotnie więcej neutrofili w porównaniu do osób zdrowych, pomimo braku cech zapalenia, jak również bez zmiany w odsetkach pozostałych komórek (84), a także podwyższone stężenie interleukiny-6 i 8 w porównaniu do osób zdrowych (85). Podobne zależności stwierdzono analizując plwocinę u tych pacjentów (86). Ponadto stwierdzono ujemną korelację pomiędzy liczbą neutrofili, a należnym FEV₁ oraz tempem spadku tej wartości (85). U pacjentów z niedoborem makrofagi uwalniają trzykrotnie więcej czynników chemotaktycznych dla neutrofili, głównie leukotrienu B₄, co jest pobudzane przez wolną elastazę. Działanie to hamowane jest w obecności AAT (84). Postuluje się także obecnie antyapoptotyczne działanie AAT w prewencji rozwoju rozedmy (87).

Główna różnica w obrazie histopatologicznym pomiędzy osobami z rozedmą i prawidłowym stężeniem AAT, a pacjentami z niedoborem dotyczy obszaru zajętego zrazika, w pierwszym przypadku jest to rozedma centrozrazikowa, w drugim panacinarowa, obejmująca cały zrazik i dotycząca głównie dolnych płatów płuc. Uszkodzenie tkanki tłumaczone jest w pierwszym przypadku m.in. oksydacyjnym działaniem dymu tytoniowego i wolnych rodników uwalnianych z leukocytów na cząsteczki AAT (niedobory nabyte). W drugim spowodowane jest obniżonym stężeniem antytrypsyny, mniejszą zdolnością zmutowanych cząsteczek AAT do hamowania elastazy oraz prozapalnym działaniem polimerów AAT, prowadzących do zwiększenia ilości neutrofili (60;88).

Z drugiej strony być może to właśnie występowanie polimerów AAT jest przyczyną tak stosunkowo dużej częstości z jaką allele deficytowe występują w populacji ogólnej. Polimery mogły wykazywać funkcję ochronną w erze przedantybiotykowej przed chorobami infekcyjnymi, skupiając i pobudzając reakcję zapalną w tkance płucnej i przewodzie pokarmowym. Obecnie, w związku z wydłużeniem życia, rozpowszechnieniem palenia tytoniu i obecnością antybiotyków nie odgrywają już funkcji protekcyjnej, a znaczenie kliniczne zyskuje rola w patogenezie chorób płuc i wątroby (89).

1.9.2.2 Objawy płucne

U osób z niedoborem zazwyczaj POChP rozwija się w wieku 32 – 41 lat w przypadku palaczy. Rzadko dochodzi do objawów przed 25 rokiem życia. Palacze i byli palacze są szczególnie narażeni, chociaż notowano przypadki osób palących i niepalących z niedoborem, a bez objawów. U blisko 30% osób niepalących z ciężkim niedoborem nie występują objawy płucne (60;90;91). Pacjenci podają głównie duszność w czasie wysiłku (84%), świsty podczas infekcji dróg oddechowych (76%), jak również świsty bez objawów zakażenia (65%), kaszel (42%), kaszel z odksztuszeniem co najmniej 3 tygodnie w roku (50%), przewlekły produktywny kaszel przez 3 miesiące przez co najmniej 2 lata (8-40%), napadowe świsty i duszność charakterystyczne dla diagnozy astmy (71).

W czasie dwóch pierwszych dekad życia występują głównie objawy związane z wątrobą, podczas gdy funkcja płuc jest identyczna jak w populacji generalnej. Po tym okresie może dojść do zaburzenia funkcji płuc, ubytek FEV₁ raportowany jest w granicach od 51 do 317 ml na rok u osób aktywnie palących. Osoby z ciężkim niedoborem mają skrócone średnie przeżycie, głównie z powodu rozwoju rozedmy (72%), natomiast marskość wątroby jest przyczyną zgonu u 10% (92). Czynnikiem ryzyka rozwoju rozedmy jest palenie papierosów, zapalenia płuc w wywiadzie, napady kaszlu i odksztuszenia, oraz świstów bez objawów przeziębienia, a także występowanie rozedmy w wywiadzie rodzinnym. Nałogowe palenie papierosów przyspiesza rozwój rozedmy o około 19 lat. (71).

Brak jest specyficznych objawów fizykalnych; do najczęstszych należą świsty, beczkowata klatka piersiowa, ściszenie szmerów oddechowych u podstawy płuc, osłabienie mięśni. Spirometria powinna zostać wykonana celem różnicowania z

astmą. Diagnostyka obejmuje także pomiar objętości płuc (metodą rozcieńczania helu), pletyzmografię całego ciała, oraz pojemność dyfuzyjną CO po jednym wdechu. W spirometrii występuje obniżenie wartości FEV₁ oraz prawidłowa lub także obniżona wartość FVC. Komponenta obturacyjna, związana z utratą włókien elastycznych tkanki śródmiąższowej i zapadaniem się, poza tym prawidłowych dróg oddechowych, powoduje obniżenie stosunku FEV₁/FVC. Utrata tychże włókien prowadzi do zwiększenia podatności płuc, ich hiperinflacji oraz wzrostu objętości zalegającej oraz całkowitej pojemności płuc. Z powodu zatrzymywania powietrza w słabo wentylowanych, zapadniętych obszarach, wartość statycznej pletyzmografii jest większa od wyników otrzymanych po rozcieńczeniu inhalowanego gazu. Rozedma wpływa także na wymianę gazową, powodując zmniejszenie pojemności dyfuzyjnej oraz zwiększenie gradientu pęcherzykowo – tętniczego dla tlenu. Stąd też zalecana w diagnostyce jest gazometria krwi tętniczej (71).

W badaniach obrazowych zmiany pojawiają się w zaawansowanym stadium, obejmują w rentgenogramie klatki piersiowej obraz rozedmowy, większą przejrzystość i hiperinflację tkanki płucnej, zwłaszcza w dolnych partiach; przepona jest płaska i obniżona, wzrasta przednio-tylny wymiar klatki piersiowej, oraz dochodzi do poszerzenia przestrzeni zamostkowej. Spłaszczenie przepony w projekcji bocznej jest najbardziej charakterystyczne. Rysunek naczyniowy jest zmniejszony, zwłaszcza w dolnych płatach, w przeciwieństwie do zaniku rysunku w przypadku rozedmy nie mającej związku z niedoborem AAT, do którego dochodzi w płatach górnych. Współtowarzyszące powiększenie wnękowych tętnic płucnych świadczy o możliwym rozwoju nadciśnienia płucnego. W tomografii komputerowej występuje charakterystyczna rozedma panacynarna, szczególnie w dolnych częściach. Naczynia płucne są mniej liczne i mniejsze. Pęcherze rozedmowe są bardziej charakterystyczne dla rozedmy niezależnej od AAT. Występowanie rozstrzeni oskrzeli nie jest częste w niedoborach AAT, raczej wynika ze zmian rozedmowych w miąższu płucnym. Obecnie najbardziej czułą metodą diagnostyczną pozostaje CT, zwłaszcza z wykorzystaniem pomiarów gęstości tkanki płucnej (93;94).

Badania dotyczące historii naturalnej niedoborów AAT wskazują na rozwój rozedmy w 3 – 4 dekadzie życia, średni czas życia wynosi 40 lat u palaczy i 65 lat u osób niepalących. Ze względu na fakt, że jedynie u części osób z nasilonym niedoborem AAT dochodzi do rozwoju zmian klinicznych, przypuszczalnie, obok

palenia papierosów istnieje jakiś silny czynnik (czynniki) wpływający na przebieg choroby. Narażenie na kurz i opary, częste infekcje płucne oraz występowanie astmy pogarszają przebieg choroby. Wpływ astmy rozpatrywany jest w kontekście zwiększenia zapalenia dróg oddechowych i nasilenia destrukcji tkanki, niehamowanej przez AAT (71).

Wśród ok. 22% osób z niedoborami AAT i obturacją oskrzeli, występują co najmniej 3 z objawów astmy oskrzelowej (napadowe świsty, odwracalność obturacji, atopia, podwyższone stężenie IgE) w porównaniu do częstości 5% u pacjentów z POChP bez deficytów; odpowiedź na działanie bronchodilatacyjne jest wyższa niż w populacji ogólnej i występuje u blisko połowy chorych z niedoborem (95). Nadreaktywność oskrzeli i astma oskrzelowa mogą się pojawiać we wczesnym etapie choroby, choć ich występowanie nie przyspiesza spadku w wartości FEV_1 (96). Diagnoza astmy jest trudna ze względu na fakt, że świsty i odwracalność obturacji są częstymi objawami w obu schorzeniach. Wspomniana wysoka częstość świstów związanych z narażeniem na alergenów lub inne czynniki drażniące i objawy atopii sugerują, że astma jest częsta w niedoborach i zazwyczaj związana z POChP (97). Być może niedobór AAT wpływa na rozwój astmy, biorąc pod uwagę znaczenie elastazy i inhibitorów proteaz w patogenezie tej choroby (98-100). Astmatycy z obniżonym stężeniem AAT wykazują większą nadwrażliwość oskrzeli i obniżenie funkcji płuc (101). W przypadku niedoborów częściowych nie stwierdzono natomiast ich znaczącego wpływu na rozwój trwałej obturacji u pacjentów z astmą (102).

Dane dotyczące związku pomiędzy niedoborami częściowymi, a rozwojem POChP nie są do końca jednoznaczne. Wydaje się jednak, że fenotyp MZ zwiększa ryzyko POChP, najprawdopodobniej przy łącznym oddziaływaniu czynników genetycznych, palenia tytoniu i narażeniu środowiskowym (103). Metaanaliza badań dotyczących częstości występowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc wykazała, że ryzyko jej rozwoju jest istotnie wyższe wśród heterozygot MZ w porównaniu do homozygot M ($OR = 2,31$; 95% CI: 1,60 – 3,35). Niemniej wyniki te znajdują głównie potwierdzenie w badaniach kliniczno-kontrolnych, tracąc znamienność statystyczną w badaniach przekrojowych. Ponadto nie stwierdzono różnic pomiędzy tymi genotypami metaanalizując średnie wartości FEV_1 (104). Fenotyp SZ zwiększa ryzyko rozwoju rozedmy ($OR = 3,26$; 95% CI: 1,24 – 8,57),

zwłaszcza w przypadku palenia, czasami ten efekt jest równie silny jak w przypadku osób ZZ. W przypadku heterozygot MS ryzyko związane z rozwojem POChP jest nieznacznie zwiększone lub nawet równe populacji ogólnej (105). Nie stwierdzono większej częstości allele S w przypadku nałogowych palaczy z POChP poddawanych resekcji płuca w porównaniu do osób palących i bez obturacji, natomiast w pierwszej grupie częściej występował fenotyp MZ (106). Fenotyp MZ jest związany z obniżeniem funkcji płuc w porównaniu do homozygot M, ale tylko u osób z POChP, nie wykazując takiej zależności w grupie bez obturacji, natomiast SZ wykazuje taki wpływ tylko wśród palaczy tytoniu (107).

1.9.3. **Panniculitis i ziarniniak Wegenera**

Postuluje się wpływ niedoborów AAT na procesy immunologiczne. Występowanie alleli niedoborowych związane jest z rozwojem zapalenia naczyńówki przedniego odcinka oka (*anterior uveitis*), reumatoidalnego zapalenia stawów oraz innych kolagenoz. W większości przypadków dane są jednak niejednoznaczne, stanowiąc raczej wskazania do dalszych badań naukowych i nie powodują implikacji w postaci wytycznych. Jedyne schorzenia z tej grupy, uwzględnione w wytycznych diagnostyki niedoborów opracowanych przez *American Thoracic Society/European Respiratory Society* to martwicze zapalenie tkanki podskórnej i zapalenie naczyń c-ANCA dodatnie (71).

Martwicze zapalenie tkanki podskórnej związane z niedoborem AAT jest jego najrzadszym powikłaniem (1/1 000 osób z niedoborem). Dotyczy głównie osób z ciężkim niedoborem głównie w wieku dorosłym, objawiając się podskórnymi guzkami zlokalizowanymi przede wszystkim na kończynach dolnych. Najwcześniejszym objawem jest zapalenie tkanki łącznej (*cellulitis*) wykazujące tendencję do owrzodzeń i wycieku tłustej treści pochodzącej z martwiczych adipocytów. Zmiany pozostawiają atroficzne blizny. Czasami objawy związane są z wcześniejszym urazem. Obraz histopatologiczny wykazuje nacieki neutrofilowe i martwicę tkanki tłuszczowej. W leczeniu stosuje się dapson (108).

Ziarniniak Wegenera jest uogólnioną chorobą z zapaleniem naczyń i tworzeniem wrzodziejących ziarniniaków w układzie oddechowym i nerkach. Związany z obecnością przeciwciał klasy IgG przeciwko cytoplazmie neutrofili (c-ANCA). Proteinaza-3 (PR3), należąca do proteaz serynowych, uwalniana jest z fagocytów

wielojądrzastych. Koniec aminowy tego białka stanowi docelowy antygen dla przeciwciał c-ANCA (109). U osób z aktywnym ziarniniakiem, jako wyniki toczącego się procesu zapalnego, PR3 występuje na powierzchni neutrofilii. Granulocyty obojętnochłonne odgrywają istotną rolę w patogenezie tego schorzenia, w obrębie zajętych tkanek występuje ich zwiększona liczba, a ilość aktywnych neutrofilii koreluje ze stopniem zajęcia nerek. Przeciwciała c-ANCA aktywują neutrofile wiążąc się do PR3 i tworząc wiązania poprzeczne częścią Fc z FcγRII. Monocyty także wykazują obecność PR3 i działanie stymulujące przeciwciał c-ANCA do wytwarzania interleukiny-8 w podobnym mechanizmie (110). AAT, naturalny inhibitor PR3, blokuje wiązanie przeciwciał c-ANCA do neutrofilii i ich aktywację oraz wybuch tlenowy, podobnie jak aktywację monocytów i produkcję interleukiny-8. Potwierdza to postulowana rolę zaburzenia równowagi proteazy-antyproteazy w rozwoju ziarniniaka Wegenera (111).

Wykazano zwiększoną częstość występowania allela Z wśród osób z zapaleniem naczyń i obecnością przeciwciał c-ANCA, częstość ta wzrasta wraz z zawężeniem diagnozy i u osób z histologicznie potwierdzonymi ziarniniakami osiąga 33%. (112-115). Ponadto obecność allela Z wiąże się z poważniejszym rokowaniem klinicznym u tych pacjentów (116). Niemniej u homozygot Z nie stwierdzono zwiększonego występowania przeciwciał ANCA skierowanych przeciwko mieloperoksydazie lub proteinazie-3. Zatem obecność niedoboru AAT nie jest wystarczająca by doszło do rozwoju choroby, być może stanowi wtórny czynnik w patogenezie zapaleń naczyń (117). Ponieważ stężenie AAT w surowicy pozostaje w zakresie wartości prawidłowych, ten test diagnostyczny jest bezużyteczny u tych chorych.

1.9.4. Inne schorzenia związane z niedoborem AAT

Niektóre badania wskazują na związek występowania niedoborów AAT z rozwojem raka płuc (118), czy raka jelita grubego z niestabilnością mikrosatelit (119), niemniej dostępne dane są niejednoznaczne. Podobnie w przypadku tętniaków aorty brzusznej, część prac wiąże występowanie niedoborów AAT z tym schorzeniem (120), inne zaś zaprzeczają takiemu związkowi (121). Nie jest jasny też wpływ występowania niedoborów i obniżonego stężenia AAT na rozwój miażdżycy. Niektóre publikacje wskazują na wyraźny rozwój miażdżycy u osób z genotypem deficytowym (122), w innych wykazano zmniejszone ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej u nosicieli allela PI*Z (123;124)

1.10. Leczenie niedoborów AAT

1.10.1. Leczenie powikłań wątrobowych

Ze względu na wysoką częstość rozwoju przewlekłych schorzeń wątroby zaleca się regularne badania kontrolne obejmujące testy wątrobowe u homozygot Z. W przypadku nasilania się objawów wątrobowych monitorowanie choroby powinno objąć regularne badania kliniczne, laboratoryjne i ultradźwiękowe. W tej grupie pacjentów profilaktyczne szczepienia przeciwko wirusom hepatotropowym HBV i HCV są wskazane ze względu na cięższy przebieg choroby w przypadku wystąpienia tych zakażeń. Chociaż nie wykazano, by spożycie alkoholu przyspieszało przebieg marskości, należy ograniczyć dzienną dawkę do 60 g, lub zachować abstynencję. U pacjentów z marskością wskazane jest obrazowanie tomografią komputerową jako badanie przesiewowe w kierunku raka wątroby. Leczenie powikłań marskości i raka wątroby, podobnie jak wskazania do transplantacji u pacjentów z krańcowymi powikłaniami ze strony wątroby, są jak w populacji ogólnej. Stosowanie terapii zastępczej u osób jedynie z powikłaniami wątrobowymi nie jest wskazane (71).

Spośród podejmowanych prób zapobiegania wewnątrzkomórkowej polimeryzacji można wymienić krótkie peptydy wpasowujące się w otwartą β -harmonijkę A nieprawidłowej cząsteczki AAT i blokujące wbudowywanie pętli reaktywnej innej cząsteczki, a przez to polimeryzację (125), oraz poszukiwanie regionów krytycznych związanych z tworzeniem polimerów, stanowiących potencjalnie docelowe miejsce dla leków (126).

1.10.2. Leczenie powikłań płucnych

Wczesne przerwanie palenia jest niezwykle istotne w prewencji rozwoju zmian płucnych, szczególnie w przypadku osób homozygotycznych, ale także wśród heterozygot. Unikanie zanieczyszczeń powietrza, kontrola infekcji płucnych i nadreaktywności oskrzeli to również teoretyczne kierunki prewencji. Zmiana zawodu w przypadku narażenia na zanieczyszczenia jest konieczna. Zalecana są również szczepienia przeciw grypowe i przeciw pneumokokowe.

W przypadku POChP z genetycznie uwarunkowanym niedoborem AAT należy wdrożyć leczenie standardowe. Często osoby te czerpią korzyść z leczenia bronchodilatoryjnego, nawet pomimo braku stwierdzenia obiektywnej odpowiedzi. Pacjenci powinni być zachęceni do utrzymywania aktywności, aż do czasu

osiągnięcia stadium, gdy wysiłek prowadzi do hiperwentylacji i zjawiska pułapki powietrznej. W przypadku stwierdzenia nadreaktywności oskrzeli mogą być podawane wziewne steroidy, zakładając, że redukcja zapalenia w obrębie oskrzeli zmniejsza utratę wartości FEV₁. Antybiotyki należy stosować w zapaleniach oskrzeli lub górnych dróg oddechowych. W przypadku towarzyszących rozstrzeni oskrzeli wymagane jest przedłużone stosowanie leku. Ze względu na działanie redukujące naciek neutrofilowy zalecane są makrolidy, a w sytuacji oporności – β -laktamy lub chinolony. Tlenoterapia jest wskazana u pacjentów z obniżoną saturacją podczas wysiłku, suplementacja tlenu zwiększa zdolność do wykonywania wysiłku fizycznego, bez wpływu na jakość życia. W przypadku ciężkiej hipoksemii wskazana jest przewlekła tlenoterapia. Doustne steroidy są wskazane u osób z wyraźną komponentą astmatyczną, powinny być podawane jednak z ostrożnością ze względu na efekty uboczne. Oczywiście ważną rolę odgrywa rehabilitacja oddechowa i uświadomienie pacjenta (71).

Spośród potencjalnych sposobów leczenia suplementacyjnego można wymienić:

- Dożylną terapię zastępczą ludzką AAT wyizolowaną z surowicy;
- Terapię wziewną ludzką AAT lub czynnikiem rekombinowanym;
- Terapię syntetycznymi inhibitorami.

W leczeniu dożylnym oczyszczoną ludzką AAT dostępne są *Prolastin*, *Aralast* i *Zemaira*. (127). Większość badań oceniających tą terapię miała charakter obserwacyjny i wykazała, że zastępcze stosowanie AAT zmniejsza spadek wartości FEV₁, ale tylko u osób z umiarkowanym obniżeniem funkcji płuc (FEV₁ 30-61% wartości należnej) (128;129). Jedyne badanie z randomizacją, przeprowadzone na małej liczbie pacjentów, nie wykazano istotnej skuteczności klinicznej przy ocenie wartości FEV₁, natomiast rozwój rozedmy oceniany za pomocą tomografii komputerowej był zmniejszony w grupie leczenia suplementacyjnego, choć bez istotności statystycznej wyniku ($p = 0,07$) (130). Obecnie prowadzone jest duże badanie wieloośrodkowe z randomizacją i grupą kontrolną z placebo, w którym głównymi punktami końcowymi będą częstości zaostrzeń i progresja rozedmy oceniana pomiarem gęstości tkanki płucnej za pomocą obrazowania tomografią komputerową. Także istotnym ograniczeniem stosowania leczenia zastępczego jest jego koszt, wynoszący w 1998 roku około 28 075 – 65 973 USD rocznie (131;132).

Podjęmowane są także próby wytwarzania transgenicznej AAT u owiec lub kóz, a także rekombinowanej formy u drożdży, które to ze względu na zaburzenia glikozylacji i szybkie usuwanie z osocza mogą być stosowana tylko wziewnie. Dostępnych jest także kilka silnych syntetycznych inhibitorów elastazy neutrofilowej podawanych doustnie lub dożylnie, przebadanych w czasie podawania krótkoterminowego. Ich wyniki nie są jednak na tyle zachęcające, by podjąć długoterminowe próby. Spośród syntetycznych chaperonów podjęto próby m.in. ze stosowaniem kwasu 4-fenylomasłowego (*4-phenyl-butyric acid*), który nieznacznie zmniejszał retencję AAT i zwiększał jej stężenie w surowicy, powodując jednakże poważne niepożądane działania żołądkowo-jelitowe (133).

Spośród procedur chirurgicznych stosowane są: przeszczep jednego lub obu płuc; 5-letnia przeżywalność po przeszczepie wynosi ok. 50%. Stosowanie następnie terapii zastępczej warte jest rozważenia w czasie epizodów zakażeń i odrzucania przeszczepu. Chirurgia redukująca objętość płuc ma na celu resekcję ok. 20 – 30% najciężiej dotkniętych przez rozedmę obszarów, zwiększając wydolność wysiłkową i zmniejszając duszność. Zalecana jest u osób z zaawansowaną rozedmą i bez widocznego wpływu optymalnego leczenia na objawy duszności (71).

1.11. Diagnostyka niedoborów AAT

Testy diagnostyczne w przypadku niedoborów można podzielić na ilościowe i jakościowe.

1.11.1. Testy ilościowe

Testy ilościowe obecnie polegają głównie na pomiarze nefelometrycznym stężenia AAT w surowicy, stosowana jest także immunoelektroforeza rakietowa i immunodyfuzja radialna. Komercyjnie dostępne standardy, zwłaszcza w przypadku immunodyfuzji radialnej, przeszacowują wyniki o około 35 – 40%. Aby je odróżnić, w przypadku nieoczyszczonych standardów stosuje się w USA jednostki w mg/dl, natomiast w przypadku oczyszczonych zgodnie z NIH – w $\mu\text{l/l}$. W Europie konwencja ta nie jest zachowywana. Nefelometria może także przeszacowywać stężenie AAT, ponieważ dochodzi do interferencji z lipidami i hemoglobina. Za graniczny poziom ochronny uznaje się wartość 11 $\mu\text{mol/l}$ (odpowiadający 50 mg/dl w przypadku nefelometrii, oraz 80 mg/dl dla immunodyfuzji radialnej) wynikający z obserwacji, że wśród heterozygot mających wartości wyższe od podanego rzadko

dochodzi do rozwoju rozedmy. Przy ich ocenie należy pamiętać, że AAT należy do białek ostrej fazy, jej stężenie w czasie odpowiedzi organizmu na zapalenie lub uszkodzenie wzrasta 3 – 4 krotnie (71).

Tabela 2.
Zakres stężenia AAT w surowicy w zależności od fenotypu [Za: (71); zmieniono].

Fenotyp	Stężenie AAT w $\mu\text{mol/l}$	Stężenie AAT w mg/dl
MM	20 – 48	150 – 350
MS	18 – 52	110 – 340
MZ	17 – 33	90 – 210
SS	15 – 33	100 – 200
SZ	8 – 16	75 – 120
ZZ	2,5 – 7	20 – 45
<i>Null-null</i>	0	0

1.11.2. Testy jakościowe

Testy jakościowe polegają na ocenie fenotypu i opierają się na identyfikacji poszczególnych wariantów AAT dzięki ich separacji metodą ogniskowania izoelektrycznego (IEF – *isoelectric focusing*). Fenotypowanie jest jednak skomplikowane, wymaga doświadczenia i umiejętności.

Do metod jakościowych zalicza się także coraz powszechniej dostępną diagnostykę genetyczną. Poszczególnym wariantom, odkrytym początkowo za pomocą elektroforezy, przypisano odpowiednie allele genu, nazywając je analogicznie do przyjętego systemu. Genotypowanie zazwyczaj odbywa się na materiale wyizolowanym z krwi obwodowej, znane mutacje można wykrywać metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) lub za pomocą sond molekularnych.

1.11.3. Fenotypowanie za pomocą ogniskowania izoelektrycznego białka

Metoda ta jest szeroko stosowana w rozdziale białek, które w gradiencie pH migrują w kierunku anody lub katody, aż do tego momentu, gdzie występuje taka wartość pH, w której całkowity ładunek cząsteczki wynosi zero (punkt

izoelektryczny – P_i). Kiedy cząsteczka białka opuszcza obszar z właściwym jej pI , zyskuje ładunek i migruje wstecz (zjawisko ogniskowania). Ruch białek wywołowany jest polem elektrycznym.

Ogniskowanie izoelektryczne w przypadku diagnostyki niedoborów AAT przeprowadza się zazwyczaj w wąskim gradiencie pH w żelach agarozowych (134-136) lub poliakrylamidowych (137), stosując następnie barwienie z użyciem *Coomassie Brilliant Blue* lub srebrzenie azotanem srebra

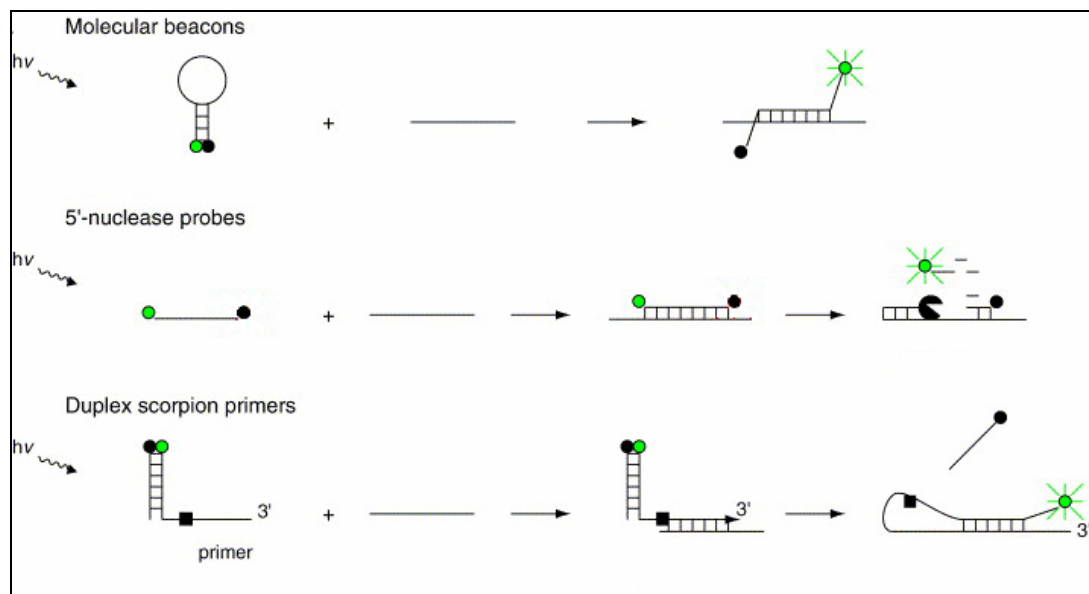
1.11.4. Real-time PCR

Real-time PCR jest metodą służącą zarówno do oceny ilościowej materiału genetycznego, jak i analizy ekspresji genów, oraz diagnostyki jakościowej badanego DNA, czyli genotypowania. Wprowadzony został on do powszechnego użycia w roku 1996 i od tego momentu liczba publikacji z zastosowaniem tej metody rośnie w postępie geometrycznym. Mierzony sygnał fluorescencji jest proporcjonalny do ilości produktu PCR i jest generowany przez barwniki fluorescencyjne specyficzne do dwuniciowego DNA (np. SYBR Green I) lub przez znakowane fluorescencyjnie sondy oligonukleotydowe (138;139). W drugim przypadku sygnał jest zależny od zmniejszenia wygaszania fluorescencji lub od wzrostu rezonansowego transferu energii wzbudzania fluorescencji (FRET), pomiędzy barwnikiem fluorescencyjnym służącym jako donor, a drugim barwnikiem – akceptorem. Zjawisko FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), zwane także przejściem Förstera, polega na bezpromienistym przejściu energii wzbudzenia przez oddziaływanie typu dipol-dipol pomiędzy fluorochromami. Warunkiem jest nachodzenie spektrum emisji donora na spektrum absorpcji akceptora, oraz bliska odległość obu cząsteczek (140). W przypadku oligonukleotydów specyficznych względem sekwencji, działających na zasadzie wygaszania fluorescencji wyróżniamy:

- sondy degradujące (typu *TaqMan*), zastosowane w niniejszej pracy, gdzie fluorescencja jest rejestrowana dopiero po strawieniu sondy;
- sondy typu „*molecular beacons*”, tworzące strukturę spinki do włosów, której pętla hybrydyzuje do specyficznej sekwencji i w tym momencie dochodzi do separacji wygaszacza od barwnika i rejestracji fluorescencji. Są to sondy niedegradujące, o wysokiej specyficzności, znajdujące zastosowanie w reakcjach typu *multiplex* (141);

- startery „*scorpions*”, które od końca 3’ służą jako jeden ze starterów, a z drugiej strony znajduje się specyficzna sekwencja z dołączonym barwnikiem oraz krótki oligonukleotyd komplementarny związany z wygaszaczem (czasami połączony jest z resztą sondy i tworzy strukturę szpilki do włosów, podobną jak w przypadku „*molecular beacons*”). W reakcji amplifikacji do sondy zostaje dobudowana nić DNA, a następnie koniec 5’ może hybrydyzować do sekwencji docelowej, prowadząc do odłączenia wygaszacza i przyrostu fluorescencji. Startery „*scorpions*” są wysoce specyficzne i znajdują zastosowanie w szybkich reakcjach typu *multiplex*, o krótkim czasie cyklu i hybrydyzacji (142).

Rycina 14.
Zasady działania poszczególnych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych w reakcji *real-time* PCR [Za: (141); zmieniono].



2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Niedobory alfa₁-antytrypsyny (AAT) należą do jednych z najczęstszych chorób wrodzonych wśród rasy białej. Prowadzą do rozwoju rozedmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) o wczesnym początku, oraz uszkodzenia wątroby. Wiązane są także z martwicznym zapaleniem tkanki podskórnej (*panniculitis*) oraz ziarniniakiem Wegenera. Do najczęstszych alleli niedoborowych należą: PI*S i PI*Z. W polskiej populacji brak jest wiarygodnych oszacowań ich częstości allelicznych, opartych na analizie reprezentatywnej, losowej próby populacyjnej.

Celem pracy jest:

1. Zebranie losowej, reprezentatywnej próby populacyjnej spośród mieszkańców miasta Krakowa.
2. Opracowanie szybkiej i stosunkowo taniej metody genotypowania alleli niedoborowych PI*S i PI*Z (*real-time* PCR), możliwej do zastosowania w diagnostyce dużych grup populacyjnych.
3. Walidacja opracowanej metody diagnostycznej za pomocą referencyjnej techniki genotypowania (RFLP) oraz fenotypowania (IEF).
4. Określenie częstości występowania alleli niedoborowych PI*S i PI*Z w losowej próbie populacyjnej.
5. Zestawienie wyników genotypowania z fenotypem AAT (stężenie białka AAT w surowicy) i określenie skuteczności diagnostycznej takiego pomiaru w diagnostyce niedoborów.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Losowa próba populacyjna

Celem uzyskania wiarygodnych informacji na temat częstości występowania alleli niedoborowych AAT w populacji ogólnej (generalnej) mieszkańców miasta Krakowa posłużono się metodą reprezentacyjną (143). Dobór próby przeprowadzono próbkowaniem losowym w warstwach (stratyfikacyjnym). Populację podzielono na grupy odnośnie podstawowych cech demograficznych, takich jak płeć i wiek. Populację docelową stanowili dorośli (powyżej 20 roku życia) mieszkańcy dzielnic I, V, IX, XI, XIII. Przy wyborze dzielnic miasta kierowano się homogennością populacji oraz jej reprezentatywnością w stosunku do ogólnej populacji Krakowa i Polski (po konsultacji z krakowskimi epidemiologami: Prof. dr hab. Wiesławem Jędrychowskim i Prof. dr hab. Andrzejem Pajakiem), a także odległością od miejsca badania.

Rycina 15.
Podział administracyjny miasta Krakowa. Zaznaczono miejsce rekrutacji ochotników (II Katedra Chorób Wewnętrznych CM UJ).



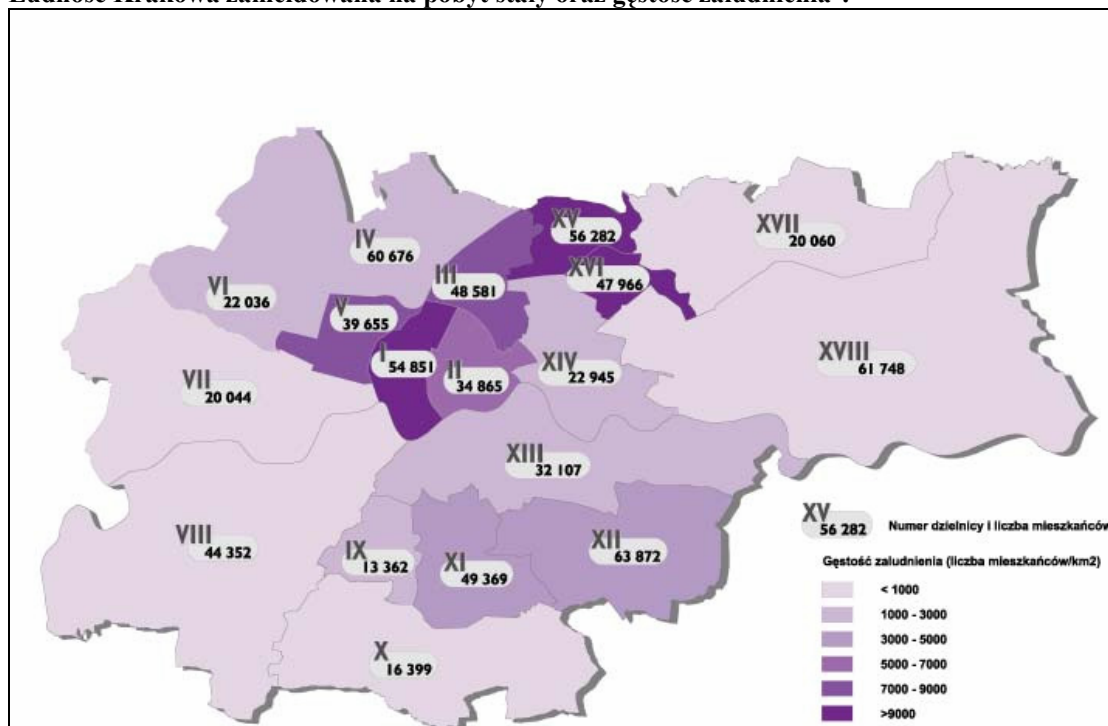
Stratyfikacji przed losowaniem dokonano analizując proporcję mężczyzn i kobiet w trzech grupach wiekowych na podstawie danych demograficznych GUS.

Tabela 3.
Struktura ludności Polski i Krakowa według płci i wieku¹.

Grupa wiekowa	Polska				Kraków			
	Mężczyźni		Kobiety		Mężczyźni		Kobiety	
0-14	3 603 007	0,093	3 416 333	0,088	54 272	0,073	51 305	0,069
15-19	1 693 547	0,044	1 628 835	0,042	28 819	0,039	28 158	0,038
20-29	3 137 891	0,081	3 034 276	0,079	64 956	0,088	66 351	0,090
30-39	2 533 251	0,066	2 460 497	0,064	44 986	0,061	47 432	0,064
40-59	5 206 139	0,135	5 431 876	0,141	99 381	0,134	116 073	0,157
60-64	744 827	0,019	909 898	0,024	15 527	0,021	19 533	0,026
65 i więcej	1 842 126	0,048	2 989 950	0,077	39 326	0,053	64 618	0,087
Ogółem	38 632 453				740 737 (1,92%)[#]			

- odsetek populacji Polski

Rycina 16.
Ludność Krakowa zameldowana na pobyt stały oraz gęstość zaludnienia².



W celu przeprowadzenia losowania uzyskano zgodę Urzędu Miasta Krakowa na udostępnienie zbioru danych osobowych. Uzyskano także zgodę lokalnej komisji

¹ Źródło GUS, stan na dzień 31 grudnia 2001 r.

² Źródło: Raport o stanie miasta 2001; http://www.krakow.pl/biznes/raport_01/wstep.html; data dostępu: styczeń 2003 r.; stan na dzień 31 grudnia 2001 r.

bioetycznej (nr KBET/365/B/2003 z dnia 27 lutego 2003 r.). Losowanie zostało przeprowadzone przez Urząd Miasta Krakowa metodą komputerową, proporcjonalnie do liczebności w każdej z wybranych dzielnic. Łącznie wylosowano 1500 osób. Na rycinie powyżej przedstawiono liczebności ludności w poszczególnych dzielnicach, poniżej w tabeli zawarto liczebności wylosowanych osób w poszczególnych warstwach.

Tabela 4.
Liczebność osób wylosowanych w poszczególnych warstwach.

Przedział wiekowy (lat)	Data urodzenia (od – do)	Mężczyźni	Kobiety
20-39	01 stycznia 1964 r. – 31 grudnia 1983 r.	286	295
40-59	01 stycznia 1944 r. – 31 grudnia 1963 r.	258	301
60 i powyżej	31 grudnia 1943 r. i wcześniej	142	218
Łącznie		686	814

Do wylosowanych mieszkańców wysłano drogą pocztową imienny list z zaproszeniem do uczestnictwa w badaniu (patrz Załącznik). W piśmie tym wyjaśniono dokładnie cel badania oraz zwrócono uwagę na konieczność pozostania na czczo (ze względu na wykonanie badania lipidogramu). Zawarto także informację o planowanym terminie rekrutacji i szczegółową mapkę z adresem Kliniki. Uwzględniono możliwości kontaktu telefonicznego celem wyjaśnienia wszelkich wątpliwości i odpowiedzi na pytania uczestników. Przeprowadzono także akcję promocyjną w lokalnej telewizji, radiu oraz gazetach celem zwiększenia odpowiedzi na zaproszenia. Wstępna analiza wyników dotyczących wskaźnika odpowiedzi w poszczególnych warstwach na pierwszy list była podstawą decyzji o wysłaniu ponownego zaproszenia do osób, które nie odpowiedziały na pierwsze wezwanie.

Rekrutację przeprowadzono w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ (ul. Skawińska 8, Kraków).

Wszystkim zgłaszającym się uczestnikom, zgodnie z zaleceniami *Good Clinical Practice* i Komisji Bioetycznej UJ, ustnie wyjaśniono cel badania, a następnie uzyskano świadomą i pisemną zgodę na: (i) uczestnictwo w badaniu, (ii) pobranie materiału do badań genetycznych oraz (iii) oświadczenie dotyczące informowania o

uzyskanych wynikach badań genetycznych i w związku z tym przetwarzanie danych osobowych. Każdy z ochotników otrzymał także dodatkowo pisemną informację o celach badania (patrz Załączniki).

W końcowym etapie pracy, dla zwiększenia dokładności oszacowania częstości alleli niedoborowych w populacji Krakowa, skorzystano także z próbek DNA pochodzących od losowo wybranych, niespokrewnionych mieszkańców dzielnicy Krakowa – Kazimierza. Próbki te, w liczbie 309, zostały zebrane przez Dr Magdalенę Twardowską-Liburę do celów jej pracy doktorskiej i udostępnione za jej zgodą.

3.2. *Pobranie materiału*

Od każdego ochotnika pobrano łącznie ok. 30 ml pełnej krwi obwodowej. Na objętość tą składało się: ok. 8 ml krwi pobranej do probówek na EDTA (2 probówki BD Vacutainer à 4,0 ml: morfologia i izolacja DNA, zabezpieczenie osocza wersenianowego – 2 ml); 16,5 ml na surowicę (2 probówki BD Vacutainer z żelem polimerowym celem separacji surowicy à 4 ml i jedna à 8,5 ml: lipidogram, stężenie AAT, zabezpieczenie surowicy – 4 ml); oraz 5,4 ml na 3,2% cytrynian sodu (2 probówki DB Vacutainer à 2,7 ml – zabezpieczenie osocza cytrynianowego).

3.3. *Badanie ankietowe*

Z każdym uczestnikiem przeprowadzono wywiad bezpośredni przez jednego ankietera (MK). Ankieta obejmowała zebranie podstawowych informacji o uczestniku (data urodzenia, płeć, wzrost, ciężar ciała), dokładny wywiad dotyczący palenia tytoniu (obecnie i w przeszłości w przeliczeniu na paczkolata), 4 pytania dotyczące objawów związanych z POChP (na podstawie wytycznych GOLD), 5 pytań związanych z objawami astmy oskrzelowej (na podstawie wytycznych GINA), oraz pytania o występowanie chorób przewlekłych (POChP, astma, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, marskość wątroby, zaburzenia krzepnięcia, choroby autoimmunologiczne, atopia i uczulenia). Końcowy etap ankiety obejmował pytania nt. obecnie przyjmowanych leków, wykonywanych procedur diagnostycznych wskazujących na chorobę niedokrwienną serca (próba wysiłkowa, koronarografia) oraz wywiad rodzinny obejmujący krewnych I stopnia. Część pytań w ankiecie została zawarta ze względu na możliwość późniejszego

wykorzystania uzyskanych informacji i zebranego materiału do innych badań epidemiologicznych.

3.4. Pomiar ciśnienia tętniczego

U każdego ochotnika wykonano pojedynczy pomiar ciśnienia tętniczego krwi metoda Riva-Rocci z osłuchiwaniami tonów Korotkowa używając sfigmomanometru rtęciowego. Pomiary zostały wykonane przez jedną osobę (MK).

3.5. Standardowe oznaczenia z krwi żyłnej

U każdego uczestnika wykonano oznaczenia morfologii krwi, pełnego lipidogramu w surowicy (cholesterol całkowity, trójglicerydy, HDL- i LDL-cholesterol) oraz stężenia AAT w surowicy metodą laserowej immunonefelometrii używając przeciwciał uzyskanych w wyniku immunizacji królików wysoce oczyszczoną ludzką AAT (Dade Behring, Germany). Oznaczenia przeprowadzano w laboratorium działającym w obrębie II Katedry Chorób Wewnętrznych, wykonującym rutynowe badania diagnostyczne.

Wyniki powyższych badań były niezwłocznie wydawane osobom uczestniczącym, wraz z ich interpretacją i stosownymi zaleceniami (MK).

3.6. Izolacja DNA

Pełną krew obwodową pobierano do próbek z antykoagulantem (EDTA). DNA izolowano stosując standardową technikę opartą na lizie choatropowej jąder krwinek białych (144). Do krwi dodawano 1/100 objętości 6% dekstranu o wysokiej masie cząsteczkowej celem sedymentacji erytrocytów, a następnie próbki były odstawiane na co najmniej 30 min. w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie osocze bogatokomórkowe (ok. 1,5 ml) było przenoszone do nowej próbówki i wirowane (10 000 x g) przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Po zlaniu osocza do próbek dodawano 400 µl DNAzol-u (Invitrogen) zawierającego roztwór lizujący, worteksowano próbki i zazwyczaj pozostawiano na noc w temperaturze 4°C. DNA strącano następnie dodając 200 µl 95% alkoholu etylowego i lekko mieszano. Precypitat DNA przenoszono do nowej próbówki z 500 µl 70% alkoholu etylowego, mieszano i zlewano alkohol. Procedurę płukania DNA powtarzano dwukrotnie, a następnie po zlaniu alkoholu próbka była suszona w cieplarni w temperaturze 37°C. W końcowym etapie DNA rozpuszczano w 300 µl wody redestylowanej i

przechowywano w temperaturze -20°C. Rutynowo nie oznaczano jego stężenia, które zazwyczaj wynosiło 50 – 300 µg/ml.

3.7. Genotypowanie metodą analizy miejsc restrykcyjnych z użyciem starterów mutagennych (test referencyjny)

Genotypowanie metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragments length polymorphism*) opracowano celem wstępnej analizy próbek i odnalezienia przypadków genotypów niedoborowych, służących następnie jako materiał wzorcowy w czasie ustawiania i optymalizowania reakcji genotypowania metodą jakościowego *real-time* PCR. Technika ta następnie służyła do walidacji opracowywanego protokołu poprzez porównanie wyników obu metod diagnostyki molekularnej.

Enzymy restrykcyjne, zwane także endonukleazami restrykcyjnymi charakteryzują się zdolnością do specyficznego rozpoznawania sekwencji nukleotydów i rozcinania obu nici DNA w ściśle określonych miejscach. Ze względu na fakt, że w czasie projektowania reakcji nie były dostępne restryktazy mogące zostać zastosowane do genotypowania analizowanych alleli niedoborowych, wprowadzono w starter flankujący amplikon od strony miejsca substytucji nukleotyd mutagenny, kreujący miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny.

Każdy proces składał się z następujących etapów:

- Amplifikacja z użyciem starterów mutagennych;
- Trawienie produktu PCR enzymami restrykcyjnymi;
- Detekcja wyników trawienia za pomocą elektroforezy.

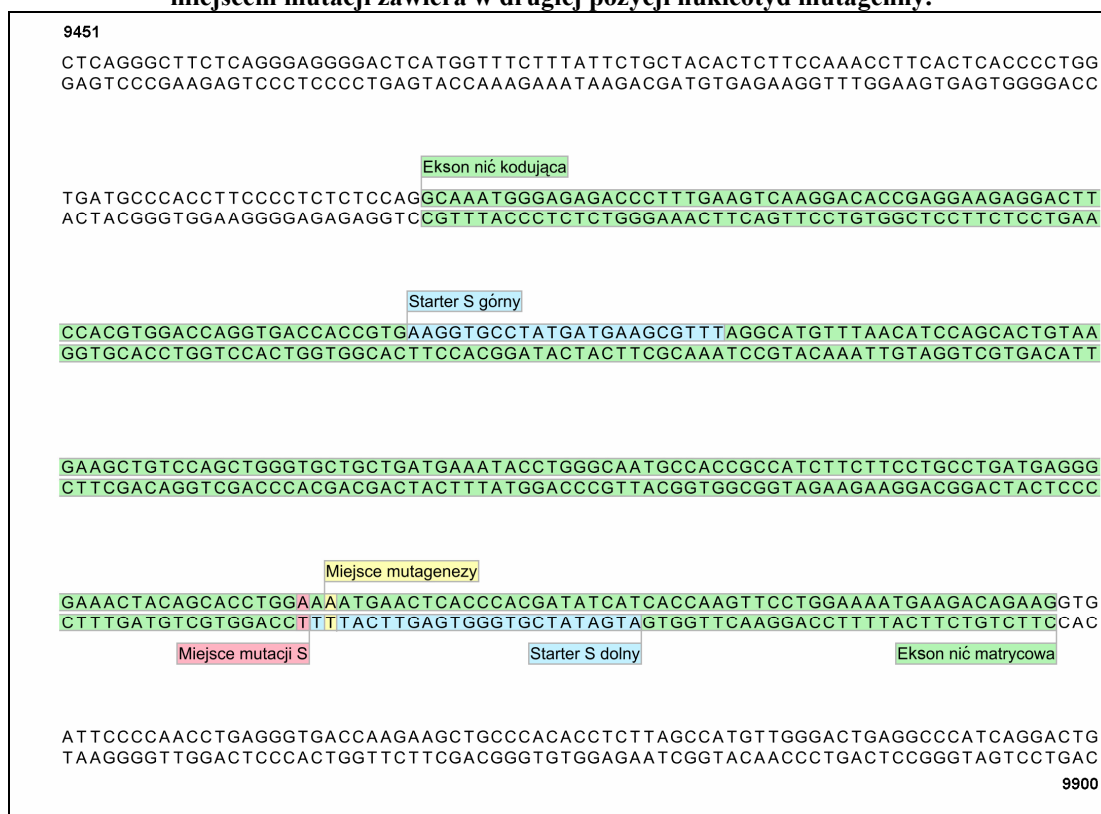
3.7.1. Amplifikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz trawienie produktu w przypadku diagnostyki mutacji S

Amplifikację produktu metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) przeprowadzano z użyciem pary starterów: 5'-AAG GTG CCT ATG ATG AAG CGT TT-3' (górny) oraz 5'-ATG ATA TCG TGG GTG AGT TCA TGT-3' (dolny). W dolny starter hybrydujący zaraz za miejscem mutacji S wprowadzono w drugiej pozycji nukleotyd mutagenny (wytluszczone). Wszystkie stosowane w pracy oligonukleotydy zostały zaprojektowane przy użyciu oprogramowania *Oligo – Primer Analysis Software* ver. 5.0 (Molecular Biology Insight). Do mieszaniny reakcyjnej w objętości 25 µl dodawano: 2 µl genomowego DNA; 0,5 j. polimerazy

Taq (Finnzymes); po 5 pmol każdego startera (TIB MOLBIOL); 2,5 nmol każdego z deoksynukleotydów (Fermentas) oraz 5 µl buforu (skład: 15 mM siarczanu amonowego; 60 mM Tris-HCl o pH 8,9; 3,5mM chlorku magnezu; 0,02% Tween 80; oraz 0,002% merkaptotoetanolu). Każda reakcja składała się z następujących etapów: początkowa denaturacja w temperaturze 96°C przez 2 minuty, 36 cykli składających się z: (i) denaturacji w 96°C przez 30 sekund, (ii) przyłączania starterów (*annealing*) w 60°C przez 30 sekund i (iii) syntezy produktu w temperaturze 72°C przez 30 sekund. Reakcja kończyła się etapem końcowej elongacji także w 72°C przez 10 minut. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze T3 (Biometra).

Rycina 17.

Schemat amplifikacji regionu obejmującego mutację S. Dolny starter hybrydujący tuż za miejscem mutacji zawiera w drugiej pozycji nukleotyd mutageny.³

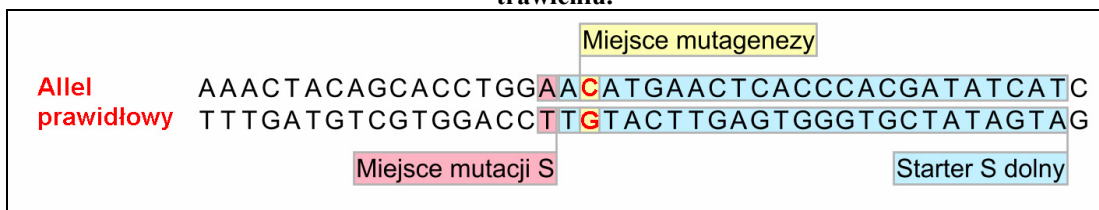


Produkt amplifikacji PCR o długości 167 par zasad był następnie poddawany trawieniu enzymem restrykcyjnym produkowanym przez bakterie purpurowe z gatunku *Rhodopseudomonas sphaeroides* (*RsaI*; Fermentas), rozpoznającym sekwencję palindromową (5'...GT↓AC...3'). W tym celu inkubowano 4 µl produktu PCR z 2 j. restryktazy przez kilkanaście godzin w temperaturze 37°C w załączonym buforze Tango™ (3,3 mM Tris-octan o pH 7,9 w 37°C; 1,0 mM octan magnezu; 66 mM octan potasu; 0,01mg/ml BSA).

³ Sekwencja ludzkiego chromosomu 14; GenBank NC_000014.7; GI:51511730.

Rycina 18.

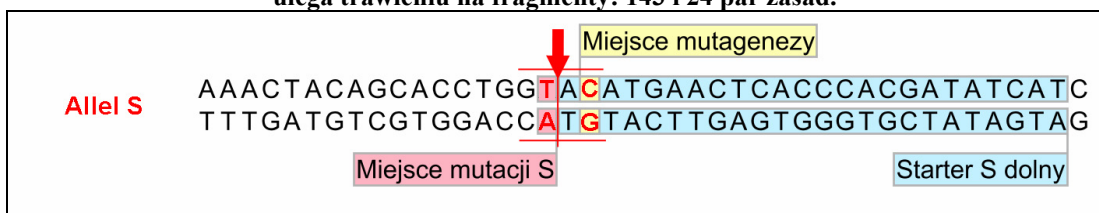
Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji S w przypadku allela prawidłowego – brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny *RsaI* i amplikon (167 bp) nie ulega trawieniu.



Produkt PCR (167 bp) nie ulegał trawieniu w przypadku występowania allela prawidłowego („dzikiego”). Obecność transwersji GAA→GTA w obrębie kodonu 288 (allel niedoborowy PI*S) powoduje powstanie sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny *RsaI*, który trawi amplikon na dwa fragmenty: 143 i 24 par zasad.

Rycina 19.

Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji S w przypadku allela niedoborowego – sekwencja 5' GTAC 3' jest rozpoznawana przez enzym restrykcyjny *RsaI* i amplikon (167 bp) ulega trawieniu na fragmenty: 143 i 24 par zasad.



3.7.2. Amplifikacja metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz trawienie produktu w przypadku diagnostyki mutacji Z

W przypadku allela niedoborowego PI*Z amplifikację produktu techniką PCR przeprowadzano z użyciem pary starterów: 5'-CAT AAG GCT GTG CTG ACC ATC GTC-3' (górny) i 5'-TTC CCA TGA AGA GGG GAG ACT TGG-3' (dolny). W tym przypadku starter górny hybrydyzował tuż przed miejscem mutacji Z i w jego przypadku w drugiej pozycji od końca wprowadzono nukleotyd mutageny (wytluszczono). Objętość mieszaniny reakcyjnej jak i jej skład były identyczne jak w przypadku amplifikacji celem analizy allela PI*S. Reakcję przeprowadzano w następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja – 96°C przez 2 min., 36 cykli składających się z denaturacji (96°C przez 30 s), przyłączania starterów i syntezy produktu (*annealing* i *elongacja*) w 68°C przez 1 min. oraz końcowa *elongacja* – 72°C przez 10 min. Amplifikacja została przeprowadzona w termocyklerze T3 (Biometra).

Rycina 20.

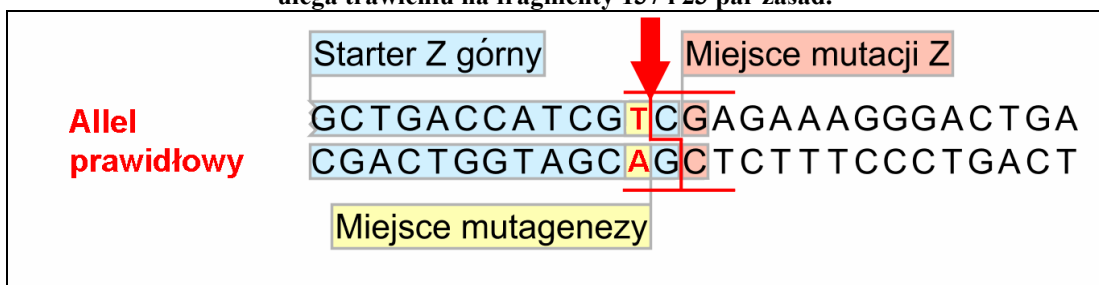
Schemat amplifikacji regionu obejmującego mutację Z. Górny starter hybrydujący tuż przez miejscem mutacji zawiera w przedostatniej pozycji nukleotyd mutageny.⁴



Następnie produkt amplifikacji o długości 160 par zasad poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym, rozpoznającym sekwencję palindromową (5'...T↓CGA...3'), pochodzącym z bakterii termofilnych *Thermus aquaticus* (*TaqI*; Fermentas). Inkubację 4 µl produktu z 2 j. enzymu przeprowadzano w temperaturze 65°C przez kilkanaście godzin, w załączonym buforze *TaqI* (1,0 mM Tris-HCl o pH 8,0 w 37°C; 0,5mM MgCl₂; 10mM NaCl; 0,01mg/ml BSA).

Rycina 21.

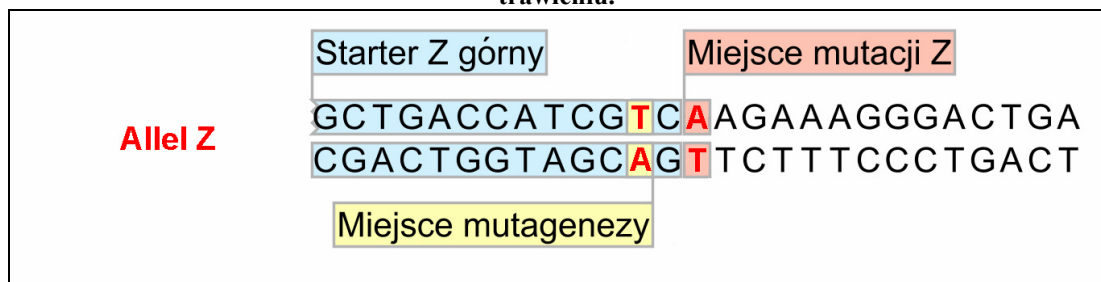
Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji Z w przypadku allele prawidłowego – sekwencja 5' TCGA 3' jest rozpoznawana przez enzym restrykcyjny *TaqI* i amplikon (160 bp) ulega trawieniu na fragmenty 137 i 23 par zasad.



W przeciwieństwie do reakcji genotypowania allele PI*S, w przypadku diagnostyki mutacji Z metodą RFLP, enzym restrykcyjny *TaqI* trawił produkt amplifikacji (160 bp) tylko przy braku obecności mutacji (allel „dziki”), na dwa fragmenty: 137 i 23 par zasad. Wystąpienie tranzycji GAG→AAG w kodonie 366 powodowało zniesienie sekwencji rozpoznawanej przez restryktazę i brak trawienia amplikonu.

⁴ Sekwencja ludzkiego chromosomu 14; GenBank NC_000014.7; GI:51511730.

Rycina 22.
Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji Z w przypadku allela niedoborowego – brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny *TaqI* i amplikon (160 bp) nie ulega trawieniu.



3.7.3. Rozdział elektroforetyczny i obrazowanie produktu trawienia

Produkt trawienia rozdzielano następnie: (i) elektroforezą w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (bufor TBE) i obrazowano prążki DNA w świetle lampy UV transluminatora sprzężonego z kamerą fotograficzną (ImagerMaster VDS-Pharmacia Biotech); lub (ii) systemem zautomatyzowanej elektroforezy w 6% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym z użyciem laserowo wzbudzanej fluorescencji (ALFExpress DNA Sequencer, Pharmacia Biotech). Drugą technikę stosowano w większości przypadków ze względu na krótszy czas elektroforezy i łatwość interpretacji wyników, co jest szczególnie istotne w przypadku analizy dużej liczby próbek oraz zastosowaniu powyższej metody jako testu referencyjnego w niniejszej pracy.

W drugim przypadku do produktu trawienia dodawano barwnika fluorescencyjnego YOYO-3 (Molecular Probes; stężenie końcowe 0,33 μM), interkalującego z dwuniciowym DNA, o spektrum absorpcji 612 nm i emisji 631 nm, a następnie przeprowadzano rozdział elektroforetyczny. Wiązka lasera helowo-neonowego ($\lambda = 608 \text{ nm}$) wzbudzała świecenie barwnika, które było rejestrowane przez fotodetektory, wzmacniane i przesyłane do oprogramowania analizującego dane i obrazującego je w postaci krzywych fluorymetrycznych (programy Alwin i Allelelinks).

3.8. Genotypowanie metodą jakościowego *real-time PCR*

Celem oszacowania częstości występowania alleli niedoborowych AAT w losowej próbie populacji Krakowa, jako metodę genotypowania zebranego materiału wybrano jakościowy *real-time PCR*, wykorzystujący technikę „5'-nuclease assay”. Do jej zalet należą: krótki czas całego procesu, oraz stosunkowo niskie koszty

odczynników i mała pracochłonność, co było szczególnie ważne przy analizie dużej liczby materiału. W reakcji *real-time* PCR biorą udział 2 pary specyficznych oligonukleotydów: pierwsza służy jako startery, drugą stanowią degradujące sondy podwójnie znakowane fluorescencyjnie – jedna specyficzna dla allela prawidłowego, druga dla niedoborowego.

Sondy i startery zostały zaprojektowane z uwzględnieniem następujących wytycznych:

- Zawartość G-C pomiędzy 20% a 80%;
- Unikanie powtórzeń tego samego nukleotydu, zwłaszcza guaniny;
- Unikanie występowania G na końcu 5' (wygaszanie fluorescencji);
- Zawartość C większa od G w przypadku sond i starterów;
- Temperatura topnienia (T_m) w zakresie 68-70°C w przypadku sond oraz 58-60°C dla starterów (temperatura topnienia sond wyższa o ok. 5-10°C od starterów);
- Pięć nukleotydów od końca 5' każdego startera powinno mieć nie więcej niż 2 G i/lub C;
- Unikanie wewnętrznej komplementarności w obrębie oligonukleotydów prowadzącej do tworzenia struktur II-rzędowych, a także między cząsteczkami prowadzących do tworzenia struktur typu primer-dimer, oraz interakcji między sondami a starterami.

Oligonukleotydy biorące udział w reakcji zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Oligo 5. Zarówno w reakcji detekcji mutacji S jak i Z, jeden ze starterów (bez nukleotydu mutagennego) został użyty z pary służącej do analizy miejsc restrykcyjnych.

Do końca 5' każdej sondy dołączono wiązaniem estrowym barwnik fluorescencyjny (ROX dla allela prawidłowego i FAM dla niedoborowego), natomiast na końcu 3' dołączono wygaszacz (*Quencher*) jednocześnie blokujący proces amplifikacji. W czasie hybrydyzacji odpowiednia, specyficzna względem sekwencji sonda przyłącza się do matrycowego DNA i ulega strawieniu przez

polimerazę, co powoduje odłączenie barwnika fluorescencyjnego i przyrost mierzonego sygnału.

Amplifikację przeprowadzano w objętości 50 µl zawierającej:

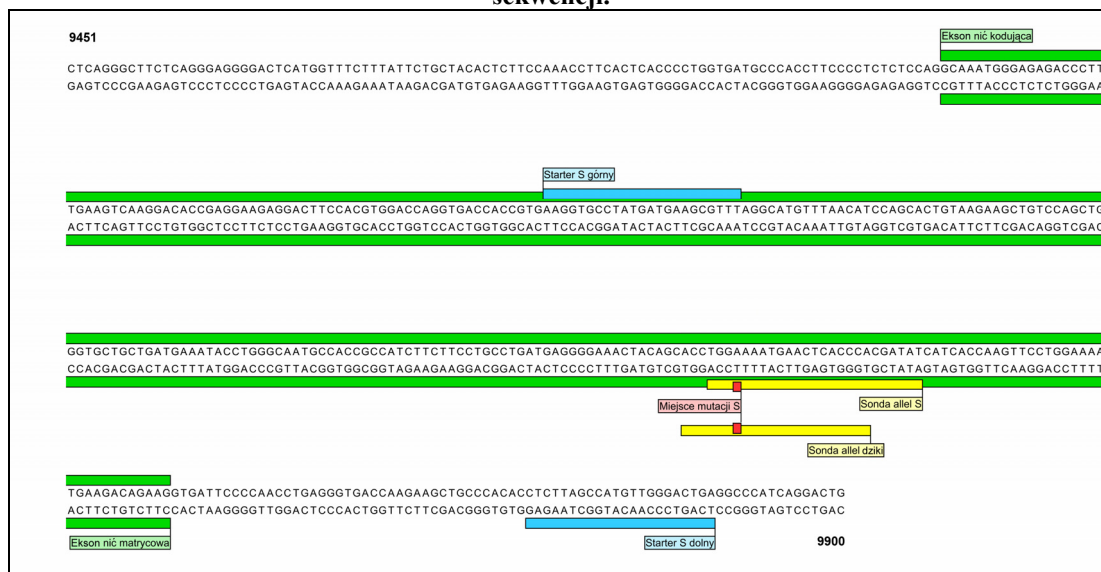
- 3 µl genomowego DNA;
- 1 j. polimerazy *Taq* (Fermentas);
- 10 pmoli każdego z pary starterów (TIB MOLBIOL);
- 2 pmoli każdej z pary sond oligonukleotydowych (IDT DNA);
- 5 nmoli każdego deoksynukleotydów (Fermentas);
- 2% dwumetylosulfotlenku (Sigma);
- 5 µl buforu (o składzie identycznym jak w przypadku RFLP).

Reakcję przeprowadzano w termocyklerze z modulem optycznym iCycler iQ (Bio-Rad). Na końcu każdego etapu anealingu-elongacji dokonywano rejestracji natężenia fluorescencji stosując odpowiednie zestawy filtrów optycznych: wzbudzenie/emisja – 490/530 nm dla FAM oraz 575/620 nm dla ROX. Reakcję przeprowadzano na płytkach 96-studzienkowych zakrytych przezroczystą folią samoprzylepną. Każda płytka zawierała dwie studzienki bez matrycowego DNA („ślepe” kontrole) oraz trzy kontrole dodatnie o znanych genotypach: „dzika” homozygota, heterozygota i homozygota niedoborowa. Wyniki genotypowania były analizowane po zakończeniu reakcji za pomocą oprogramowania iCycler iQ Optical System Software ver.3.0 (Bio-Rad).

3.8.1. Real-time PCR w przypadku diagnostyki mutacji S

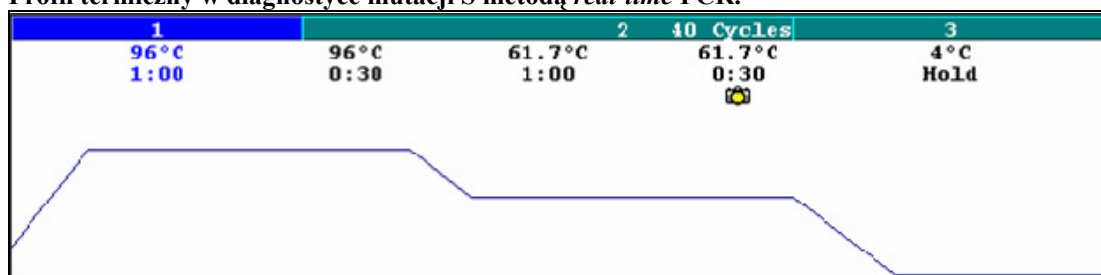
Detekcję allele PI*S przeprowadzano z użyciem pary starterów: 5'-AAG GTG CCT ATG ATG AAG CGT TT-3' (górny; identyczny jak w przypadku RFLP) i 5'-TCA GTC CCA ACA TGG CTA AGA G-3' (dolny), oraz pary sond oligonukleotydowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie: specyficznej względem allele dzikiego 5'-[ROX]-TGG GTG AGT TCA TTT TCC AGG T-[Black Hole Quencher 2] i względem allele zmutowanego PI*S 5'-[FAM]-ATA TCG TGG GTG AGT TCA TTT ACC A-[Black Hole Quencher 1] (podkreślono różniący nukleotyd). Amplifikacji ulegał odcinek 248 par zasad obejmujący miejsce mutacji S.

Rycina 23.
Schemat reakcji *real-time* PCR, celem detekcji mutacji S, z użyciem pary sond oligonukleotydowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie specyficznych względem sekwencji.⁵



Reakcję przeprowadzano w następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja w 96°C przez 1 minutę, 40 cykli składających się z denaturacji w 96°C przez 30 sekund oraz łączonego etapu przyłączania oligonukleotydów i syntezy produktu (*anealing* i *elongacja*) – 61,7°C przez 1,5 minuty. W czasie ostatnich 30 sekund dokonywano rejestracji fluorescencji w czasie reakcji używając odpowiedniego zestawu filtrów optycznych.

Rycina 24.
Profil termiczny w diagnostyce mutacji S metodą *real-time* PCR.



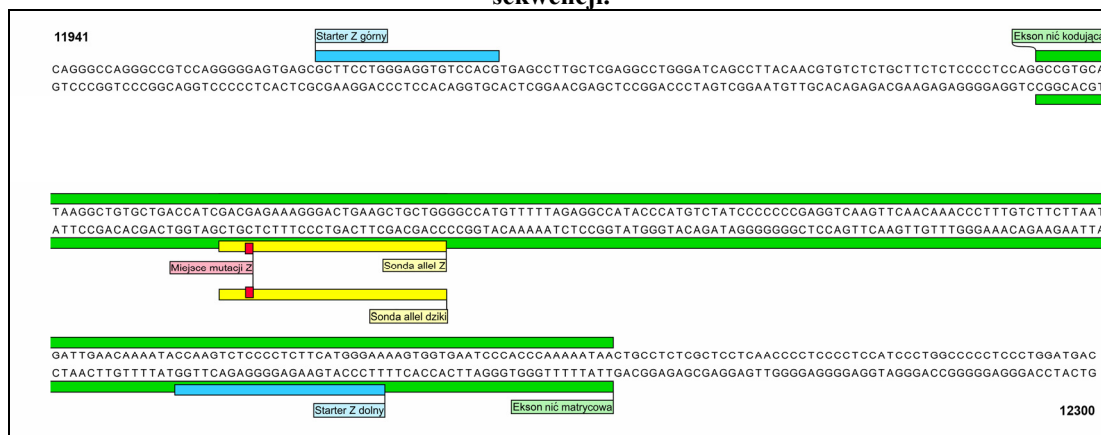
3.8.2. *Real-time* PCR w przypadku diagnostyki mutacji Z

W reakcji genotypowania allele PI*Z brała udział para starterów: 5'-GCT TCC TGG GAG GTG TCC ACG-3' (górny) i 5'-TTC CCA TGA AGA GGG GAG ACT TGG-3' (dolny, identyczny jak w przypadku RFLP) oraz para sond oligonukleotydowych: jedna specyficzna względem allele „dzikiego” 5'-[ROX]-CCA GCA GCT TCA GTC CCT TTC TCG TC-[Black Hole Quencher 2]-3' oraz

⁵ Sekwencja ludzkiego chromosomu 14; GenBank NC_000014.7; GI:51511730

druga względem allele niedoborowego PI*Z 5'-[FAM]-CCA GCA GCT TCA GTC CCT TTC TTG TC-[Black Hole Quencher 1]-3'. W tym zestawie obie sondy różniły się tylko jednym nukleotydem (podkreślono).

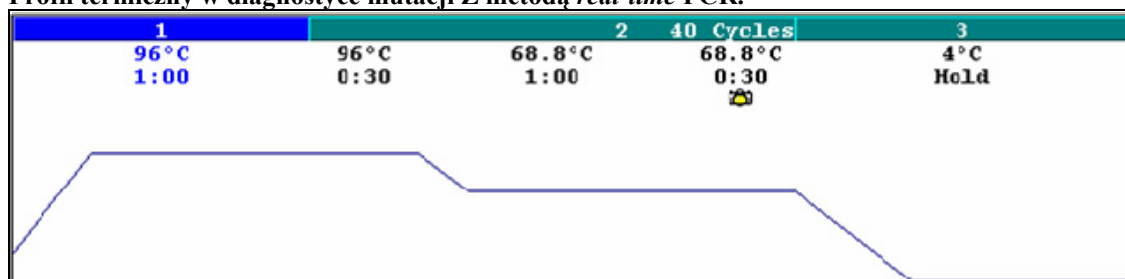
Rycina 25.
Schemat reakcji *real-time* PCR, celem detekcji mutacji Z, z użyciem pary sond oligonukleotydowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie specyficznych względem sekwencji.⁶



Reakcję przeprowadzano w podobnym profilu termicznym jak w przypadku diagnostyki allele PI*Z, oba schematy różniły się jedynie temperaturą anealingu/elongacji, która w tym przypadku wynosiła 68,8°C.

Wykres 1.

Profil termiczny w diagnostyce mutacji Z metodą *real-time* PCR.



3.9. Ogniskowanie izoelektryczne AAT na cienkich żelach poliakrylamidowych

Celem analizy próbek w przypadku których nie stwierdzono występowania któregoś z dwóch najczęstszych allele niedoborowych AAT – PI*S i/lub PI*Z, natomiast występowało obniżone stężenie AAT w surowicy wykonano fenotypowanie białka metodą ogniskowania izoelektrycznego (*isoelectric focusing* – IEF) celem potwierdzenia wyników genotypowania i ewentualnego wykrycia innych, rzadszych mutacji.

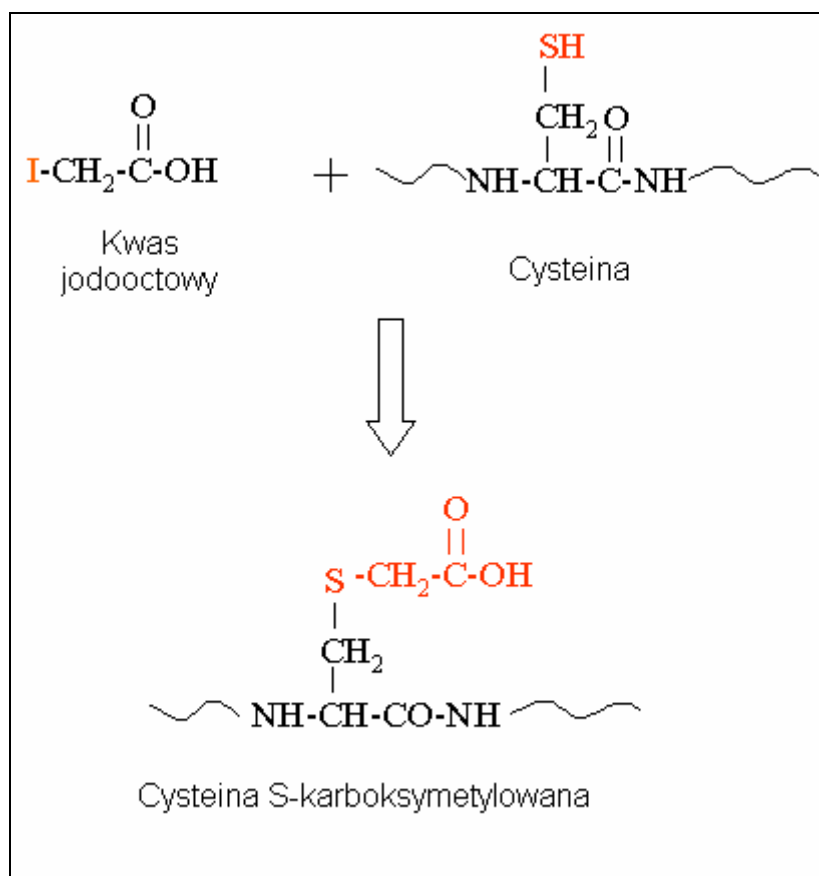
⁶ Sekwencja ludzkiego chromosomu 14; GenBank NC_000014.7; GI:51511730

3.9.1. Przygotowanie próbek (*sample pretreatment*)

Surowicę przechowywano w temperaturze -80°C . Po rozmrożeniu próbki redukowano, a następnie alkilowano celem uniknięcia tworzenia mostków dwusiarczkowych pomiędzy reaktywnymi grupami tiolowymi cysteiny. W tym celu do 10 μl rozmrożonej surowicy dodawano 2 μl ditiotreitolu – DTT (Sigma) o stężeniu 23 mM redukującego wiązania dwusiarczkowe i inkubowano przez 25 minut w 37°C , po czym dodawano 2 μl 50 mM kwasu jodooctowego (Sigma) dokonującego S-karboksymetylacji i przenoszono na 15 min. do temperatury 37°C . Celem zachowania zdolności redukujących, do przechowywanego roztworu ditiotreitolu w objętości 0,4 ml, dodawano 100 μl trójbutylofosfiny – TBP (Fluka) oraz 100 μl 1-bromo-3-chloropropanu (Fluka). Do reakcji redukcji próbek stosowano górną fazę otrzymanej zawiesiny. TBP jest silniejszym reduktorem niż DTT, natomiast o mniejszej gęstości niż woda, natomiast 1-bromo-3-chloropropan odwraca fazy, dzięki czemu zredukowany DDT znajduje się na górze próbki.

Rycina 26.

Alkilacja cysteiny w procesie przygotowywania próbek surowicy celem ogniskowania izoelektrycznego.



3.9.2. Ogniskowanie izoelektryczne

Celem przygotowania żelu ($T = 10\%$, $C = 3,3\%$) mieszano 6,25 ml 40% roztworu akrylamidu i bis-akrylamidu 29:1 (Sigma) z 17,25 ml wody destylowanej i dodawano 1,5 ml nośnika amfoterycznego (1:17) Pharmalyte (Amersham Biosciences) o wąskim zakresie pH 4,2 – 4,9. Pharmalyte jest mieszaniną około 600 – 700 różnych homologów cząsteczek amfoterycznych z zakresem punktów izoelektrycznych pomiędzy 4,2 a 4,9, tworzących gradient pH pod wpływem pola elektrycznego. Substancje te mają silne zdolności buforujące i nie wiążą się do białek ponieważ są silnie hydrofilne. Roztwór w objętości 25 ml po odpowietrzeniu za pomocą pompy próżniowej i dodaniu 125 μ l 10% nadsiarczanu amonowego (Gibco BRL) oraz 125 μ l 10% TEMED-u (Pharmacia Biotech), wylewano na GelBond PAG film (Amersham Biosciences) o wymiarach 124x258 mm używając formy UltraMould (Amersham Biosciences) i stosując przekładki o grubości 0,5 mm.

Po 24 godzinnej polimeryzacji rozpoczynano ogniskowanie izoelektryczne stosując system do horyzontalnej elektroforezy Muliphor II (Amersham Biosciences). Płyta na której umieszczano GelBond z żelem była wcześniej schłodzona do temperatury 10°C, pod żel umieszczano kilka kropel nafty celem lepszego przewodnictwa temperatury. Następnie na żel (ok. 1-1,5 cm od brzegu) nakładano paski bibułowe nasączone 0,08 molowym roztworem kwasu glutaminowego (DL) w przypadku anody (+) oraz 0,05 molowym roztworem wodorotlenku sodu od strony katody (-). Na paskach tych umieszczano odpowiednie elektrody platynowe.

Wstępne wytworzenie gradientu pH (prefokusowanie) w żelu przeprowadzano w następujących warunkach: napięcie – 3000 V; natężenie – 150 mA; moc – 5 W, czas – 30 min.; temperatura – 10°C. Następnie, po wytworzeniu w żelu gradientu pH, ok. 1 cm od katody bezpośrednio na powierzchnię żelu nakładano 4 μ l przygotowanej surowicy stosując aplikator z 52 studzienkami.

Ogniskowanie przeprowadzano w następujących warunkach: napięcie – 3000 V; natężenie – 150 mA; moc – 15 W; czas – 2,5 godziny; temperatura – 10°C. Po około półtorej godzinie elektroforezy, ze względu na przerwanie ciągłości żelu w pobliżu katody i iskrzenie przesuwno elektrodę poza to miejsce, ok. 2 cm w kierunku anody i kontynuowano eksperyment. Na 10 minut przed zakończeniem ogniskowania zwiększano moc do 20 W celem wyostrenia prążków.

3.9.3. Srebrzenie żelu

Srebrzenie żelu przeprowadzano zmodyfikowaną metodą Heukeshovena i Dernicka (145). Po zakończeniu elektroforezy usuwano elektrody, a żel bezpośrednio przenoszono do roztworu utrwalającego (30,0 g kwasu tróchlorooctowego i 125 ml alkoholu etylowego rozpuszczonych w wodzie destylowanej do 250 ml) na 60 min. celem precypitacji białek. Następnie żel płukano dwukrotnie po 15 min. w roztworze składającym się z 150 ml alkoholu etylowego i 50 ml kwasu octowego uzupełnionych do 500 ml wodą destylowaną. W roztworze inkubującym (75 ml etanolu; 17,0 g trójwodnego octanu sodowego; 0,50 g pięciowodnego tiosiarczanu sodu oraz 1,3 ml 25%_(m/V) aldehydu glutarowego dodawanego tuż przed użyciem; rozpuszczonych w wodzie destylowanej do 250 ml) żel pozostawiano na noc, a następnie trzykrotnie płukano w wodzie destylowanej przez 5 min. Roztwór srebrzący składał się z 6,25 g azotanu srebra oraz 50 μ l formaldehydu rozpuszczonych w wodzie destylowanej do 250 ml, żel umieszczano w nim na 20 min., a następnie przenoszono do roztworu wywołującego (6,25 g węglanu sodu; 75 ml etanolu; 25 μ l formaldehydu uzupełnionych do 250 ml wodą destylowaną) na 5 – 20 minut, delikatnie kołysząc, aż do pojawienia się prążków. Proces wywoływania zatrzymywano roztworem 3,0 g dwuwodnego wersenianu sodu i 75 ml alkoholu etylowego uzupełnionych do 250 ml wodą destylowaną, a następnie płukano w 30% etanolu przez 5 min. Na koniec żel zabezpieczano przez 20 min. w roztworze składającym się z 25 ml 87%_(V/V) glicerolu i 75 ml etanolu uzupełnionych do 250 ml wodą destylowaną i suszono w temperaturze pokojowej.

3.10. Analiza statystyczna

Obliczenia dotyczących częstości allelicznych i genotypowych wraz z podaniem 95% przedziału ufności wykonano za pomocą pakietu statystycznego SAS v.8.02 (SAS Institute) z modułem SAS Genetics. Zgodność częstości obserwowanych z oczekiwanymi na podstawie równowagi Hardy’ego – Weinberga oceniano testem χ^2 . Obliczone częstości alleliczne posłużyły do oszacowań liczebności poszczególnych genotypów w populacji Krakowa oraz Polski, na podstawie danych epidemiologicznych GUS.

Porównanie obserwowanych i oczekiwanych częstości pomiędzy poszczególnymi grupami ze względu na płeć i wiek osób wylosowanych a uczestniczących w badaniu, a także częstości genotypowych losowej populacji

Krakowa i Kazimierza, celem ich połączenia, wykonano testem χ^2 . W przypadku podstawowych parametrów charakteryzujących próbę populacyjną obliczono wartość średnią, odchylenie standardowe oraz medianę w grupie kobiet i mężczyzn. Zależność między stężeniem AAT w surowicy a płcią i paleniem papierosów testowano wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) a następnie wykonano testy *post hoc*. Podobnie testowano zależności pomiędzy stężeniem AAT a genotypem, oraz różnice pomiędzy w średniej wieku wśród wylosowanych i uczestniczących kobiet i mężczyzn. Celem oceny zależności stężenia AAT od innych parametrów ciągłych opisujących losową próbę populacyjną wykonano regresję wielokrotną. We wszystkich obliczeniach założono 5% poziom istotności. Powyższe obliczenia wykonano pakietem statystycznym STATISTICA v.7 (StatSoft Inc.).

Obliczenia dotyczące skuteczności diagnostycznej pomiaru stężenia AAT w surowicy w wykrywaniu niedoborów częściowych (czułość, swoistość, dokładność, wartości predykcyjne, wskaźniki wiarygodności, DOR) wraz z podaniem 95% przedziału ufności, oraz wykreślenie krzywej ROC wykonano za pomocą pakietu StatsDirect v.2.5.6 (StatsDirect Ltd.).

4. WYNIKI

4.1. Losowa próba populacyjna

4.1.1. I etap rekrutacji próby populacyjnej

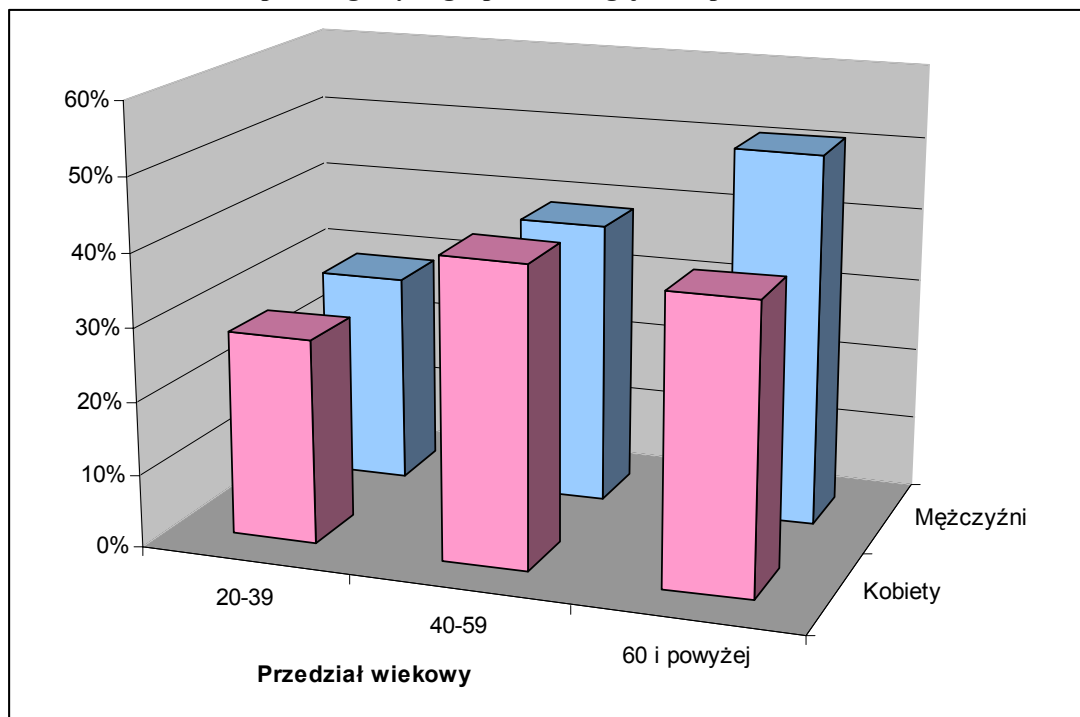
Rekrutację w I etapie przeprowadzano w terminie od 24 kwietnia do 31 lipca 2003 roku. W wysłanych zaproszeniach zaproponowano dokładną datę zgłoszenia, niemniej uwzględniono możliwość jej zmiany w zależności od potrzeb wylosowanej osoby, najlepiej po uprzednim zgłoszeniu telefonicznym. Przyjęć ochotników dokonywano w godzinach przedpołudniowych (w zależności od dnia tygodnia w godzinach 7 – 12 lub 9 – 12), ze względu na konieczność wykonania w danym dniu badań laboratoryjnych oraz zabezpieczenie materiału.

Łącznie wysłano 1500 listów z zaproszeniem do uczestnictwa w badaniu. Otrzymano 20 (1,4%) zwrotów pocztowych, jako powód zostało podane: „adresat nieznany” lub „adresat zmarł”, oraz w 11 (0,7%) przypadkach informację przekazaną telefonicznie o niezgłoszeniu się uczestnika (główny powód: pobyt poza granicami kraju).

W wyznaczanych terminach zgłaszało się średnio 9,3 osób dziennie (zakres: 0 – 23). W czasie I etapu badania zrekrutowano 523 ochotników (233 mężczyzn i 290 kobiet), współczynnik odpowiedzi wyniósł zatem 34,9%. W poszczególnych grupach przedziałach wiekowych współczynniki te wyniosły dla osób urodzonych w latach: 1983-1964 – 21% i 28% (odpowiednio dla grupy mężczyzn i kobiet); w latach 1963-1944 – 39% i 41%; oraz latach 1943 i wcześniej: 51% i 39%.

Najniższą odpowiedź zanotowano w grupie mężczyzn w wieku 20-39 lat, natomiast najwyższą w grupie mężczyzn, w wieku 60 lat i powyżej. Ogólnie, najwyższe współczynniki odpowiedzi wystąpiły w grupie w starszym wieku (łącznie 44%), natomiast najniższe w grupie wiekowej 20-39 lat (łącznie 24%).

Wykres 2.
Współczynniki odpowiedzi w I fazie rekrutacji losowo wybranych mieszkańców Krakowa w poszczególnych grupach ze względu na płeć i wiek.



4.1.2. II etap rekrutacji próby populacyjnej

Ze względu na najniższą odpowiedź w grupie wiekowej 20-39 lat przeprowadzono drugą fazę rekrutacji w tej subpopulacji osób. Przygotowano ponowne zaproszenie imienne do udziału w badaniu z podanymi terminami zgłoszenia do wyboru. Łącznie wysłano 432 ponownych zaproszeń (pominięto rekordy dla których uzyskano informację o nieprawidłowości adresu lub braku możliwości uczestniczenia w badaniu). Rekrutacje przeprowadzano w dniach 19 kwietnia – 17 maja 2004 roku. Średnio zgłaszało się 2,2 osoby dziennie (zakres: 0-6). Łącznie zrekrutowano 27 osób (15 mężczyzn i 12 kobiet), współczynnik odpowiedzi wyniósł zatem 6,3%. Ze względu na niską odpowiedź na powtórne zaproszenia do uczestnictwa w badaniu odstąpiono od dalszego wysyłania listów. Odpowiedź w grupie wiekowej 20-39 po uwzględnieniu powtórnej rekrutacji wyniosła 25,9% wśród mężczyzn i 31,9% wśród kobiet.

4.1.3. Losowa próba populacyjna

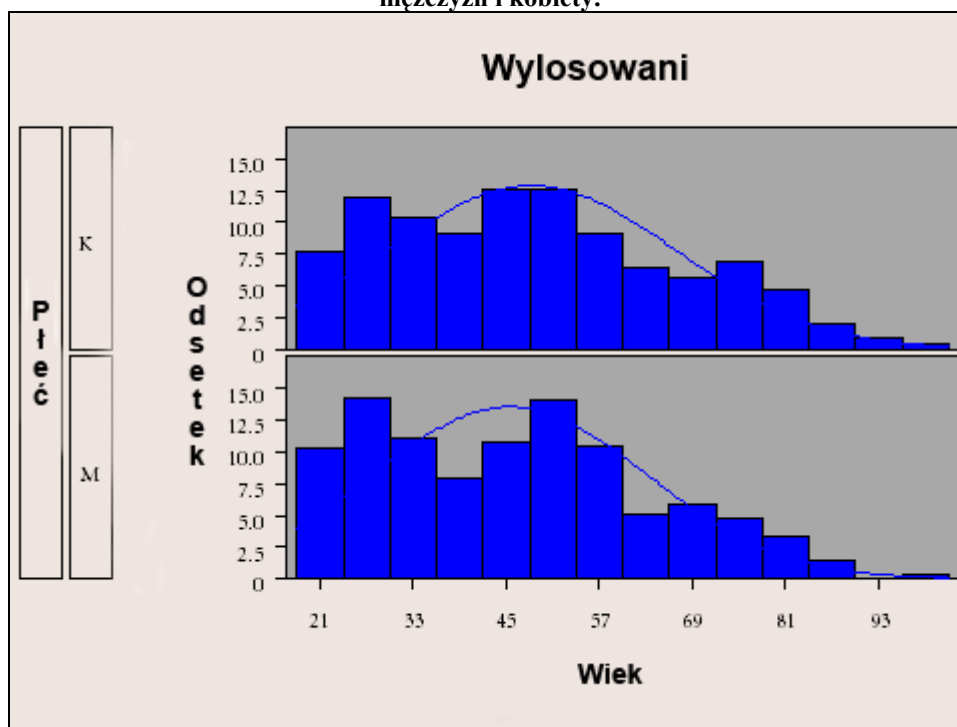
Spośród wylosowanych 1500 mieszkańców miasta Krakowa do uczestnictwa w badaniu łącznie zgłosiło się 550 osób (248 mężczyzn i 302 kobiet). Współczynnik odpowiedzi wynosi zatem 36,7%. Średnia wieku wśród mężczyzn wyniosła 49,9 lat (SD 17,5; zakres 20-87), natomiast wśród kobiet 49,4 (SD 17,2; zakres: 20-90).

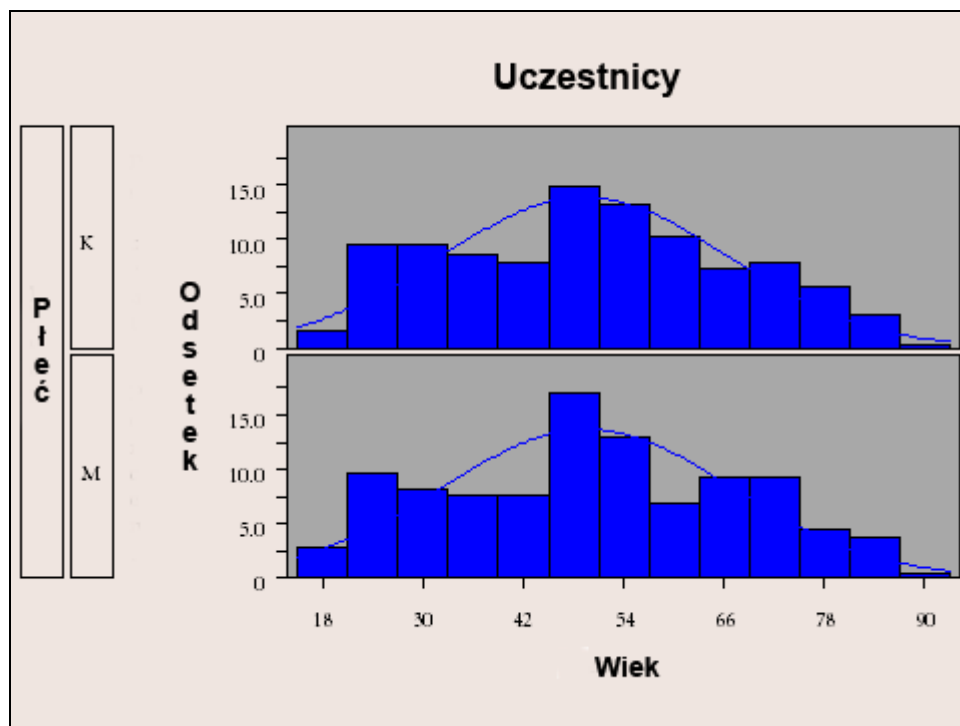
Tabela 5.
Liczebności i odsetki osób wylosowanych i uczestniczących w grupach ze względu na płeć i wiek,
oraz porównanie z populacją Krakowa.

Przedział wiekowy (lat)	Populacja Krakowa		Wylosowani		Uczestnicy	
	Mężczyźni (odsetek)	Kobiety (odsetek)	Mężczyźni (odsetek)	Kobiety (odsetek)	Mężczyźni (odsetek)	Kobiety (odsetek)
20-39	109 942 (0,190)	113 783 (0,197)	286 (0,191)	295 (0,197)	74 (0,135)	94 (0,171)
40-59	99 381 (0,172)	116 073 (0,201)	258 (0,172)	301 (0,201)	102 (0,185)	122 (0,222)
60 i powyżej	54 853 (0,095)	84 151 (0,146)	142 (0,095)	218 (0,145)	72 (0,131)	86 (0,156)
Ogółem	578 183		1 500		550	

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w liczebnościach poszczególnych warstw pomiędzy grupą wylosowanych a uczestniczącą ($\chi^2 = 15,3$; $df = 5$; $p = 0,0091$). Największe różnice są widoczne w grupie wiekowej 20 – 39 lat. Rozkład wieku wśród osób wylosowanych i uczestniczących w grupie mężczyzn i kobiet przedstawiono na histogramach poniżej.

Rycina 27.
Rozkład wieku (w latach) w grupie osób wylosowanych i uczestniczących z podziałem na mężczyzn i kobiety.





Jak widać na powyższych histogramach, zarówno w podgrupie mężczyzn jak i kobiet, rozkład wieku wśród osób uczestniczących w porównaniu do wylosowanych jest przesunięty w stronę wyższych wartości. Wieloczynnikowa analiza wariancji wykazała znaczącą różnicę pomiędzy grupą osób wylosowanych a uczestniczących w średniej wieku ($47,02 \pm 18,17$ lat vs $49,52 \pm 17,34$; $p = 0,0034$).

Tabela 6.
Średnia i mediana wieku w grupie osób wylosowanych i uczestniczących.

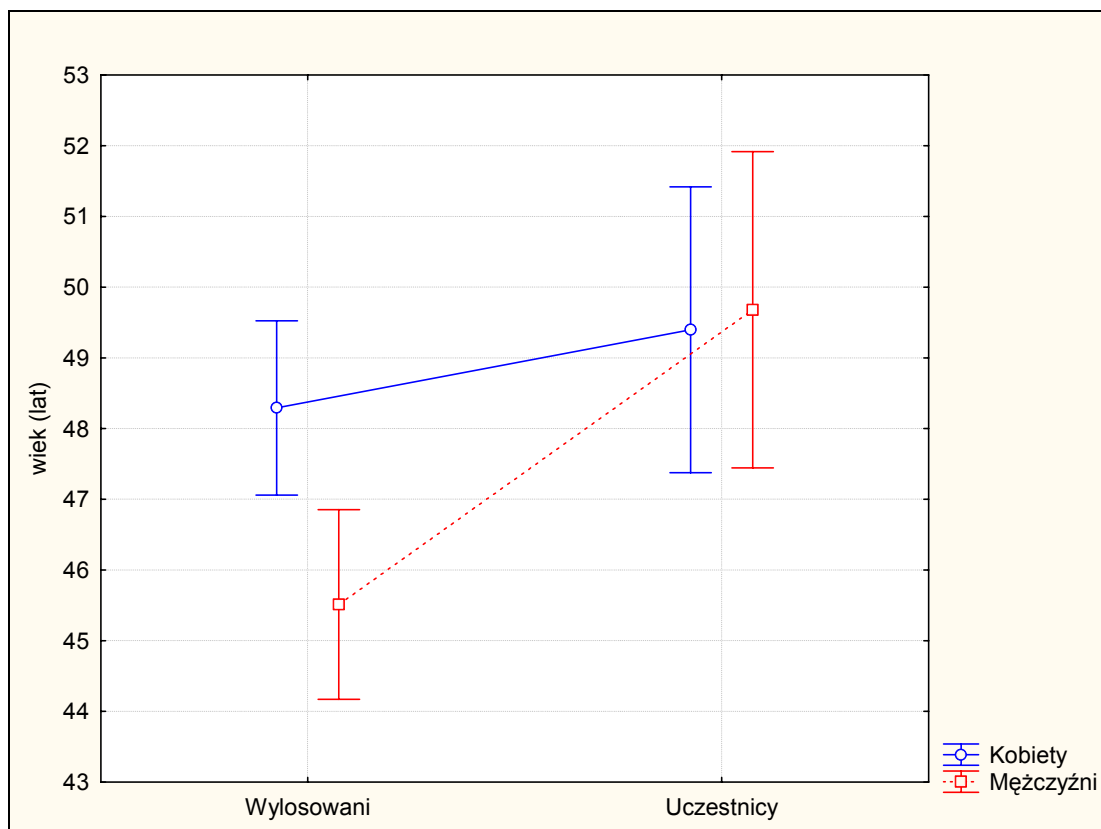
Płeć	Wylosowani		Uczestnicy	
	Średnia (SD) [95% CI]	Mediana (zakres międzykwartylowy)	Średnia (SD) [95% CI]	Mediana (zakres międzykwartylowy)
Mężczyźni	45,51* (17,60) [44,2 – 46,8]	46 (27)	49,68 (17,49) [47,5 – 51,9]	49 (27)
Kobiety	48,29 (18,55) [74,0-49,6]	47 (29)	49,40 (17,24) [47,5 – 51,3]	50 (28)

* - statystycznie znacząca różnica względem grupy wylosowanych kobiet ($p = 0,0146$); uczestniczących mężczyzn ($p = 0,0093$) oraz uczestniczących kobiet ($p = 0,0092$). Analizę wykonano testem *post hoc* Tukey'a.

Wyniki testu *post hoc* Fisher'a LSD przedstawiono na wykresie poniżej. Średnia wieku w grupie mężczyzn uczestniczących w badaniu jest wyższa o 4,17 roku (95%

CI: 1,56 – 6,78) w porównaniu z wylosowanymi. Pomiedzy grupą kobiet uczestniczących a wylosowanych nie stwierdzono istotnych różnic.

Wykres 3.
Średni wiek z 95% przedziałem ufności w zależności od płci i grupy osób wylosowanych i uczestniczących.



4.2. Podstawowe parametry

W poniższej tabeli przedstawiono podstawowe cechy, opisujące losową próbę populacyjną (wiek, wzrost, waga) oraz wyniki badań morfologii krwi, lipidogramu i stężenia AAT w surowicy krwi.

Tabela 7.
Podstawowe parametry opisujące losową próbę populacyjną.

Cecha	Płeć					
	Mężczyźni			Kobiety		
	Średnia	SD	Mediana	Średnia	SD	Mediana
Wiek (lat)	49,68	17,49	49,00	49,40	17,24	50,00
Wzrost (cm)	175,57	7,10	176,00	162,59	6,44	163,00

Cecha		Płeć					
		Mężczyźni			Kobiety		
		Średnia	SD	Mediana	Średnia	SD	Mediana
Waga (kg)		81,00	12,35	80,00	65,20	12,96	63,00
Ciśnienie tętnicze	Skurczowe (mm Hg)	132,75	21,38	130,00	125,15	21,20	120,00
	Rozkurczowe (mm Hg)	87,09	13,00	85,00	81,11	11,72	80,00
Morfologia	Leukocyty (tyś./ μ l)	6,06	1,52	5,80	5,72	1,52	5,50
	Hemoglobina (g/dl)	4,82	0,41	4,84	4,35	0,29	4,37
	Erytrocyty (mln/ μ l)	15,12	1,15	15,20	13,52	0,89	13,50
	Hematokryt (%)	44,11	3,14	44,10	39,96	2,57	40,00
	MCV (fl)	91,72	4,53	91,40	91,91	4,25	92,40
	MCH (pg)	31,45	1,86	31,35	31,11	1,60	31,20
	MCHC (g/dl)	34,29	1,08	34,30	33,85	0,82	33,90
	Płytki krwi (tyś./ μ l)	216,06	57,34	206,00	233,74	49,90	231,00
	Limfocyty (%)	32,54	7,51	32,60	33,81	7,63	34,25
	Bazo, Eo, Mono (%)	9,77	3,16	9,40	9,37	2,94	9,15
	Neutrofile (%)	57,71	8,19	57,95	56,83	8,69	56,25
	Cholesterol (mmol/l)	5,18	1,16	5,10	5,21	0,99	5,00
Lipidogram	Cholesterol HDL (mmol/l)	1,34	0,34	1,30	1,64	0,37	1,61
	Cholesterol LDL (mmol/l)	3,02	0,92	2,94	2,98	0,92	2,99
	Trójglicerydy (mmol/l)	1,76	1,20	1,37	1,26	0,73	1,07
	Stężenie AAT (g/l)	1,21	0,21	1,19	1,27	0,23	1,24

Wśród uczestników, 260 osób (47,28%) oświadczyło, że nigdy nie paliło tytoniu, 138 (25,09%) paliło w przeszłości, a 152 (27,63%) było aktualnymi palaczami.

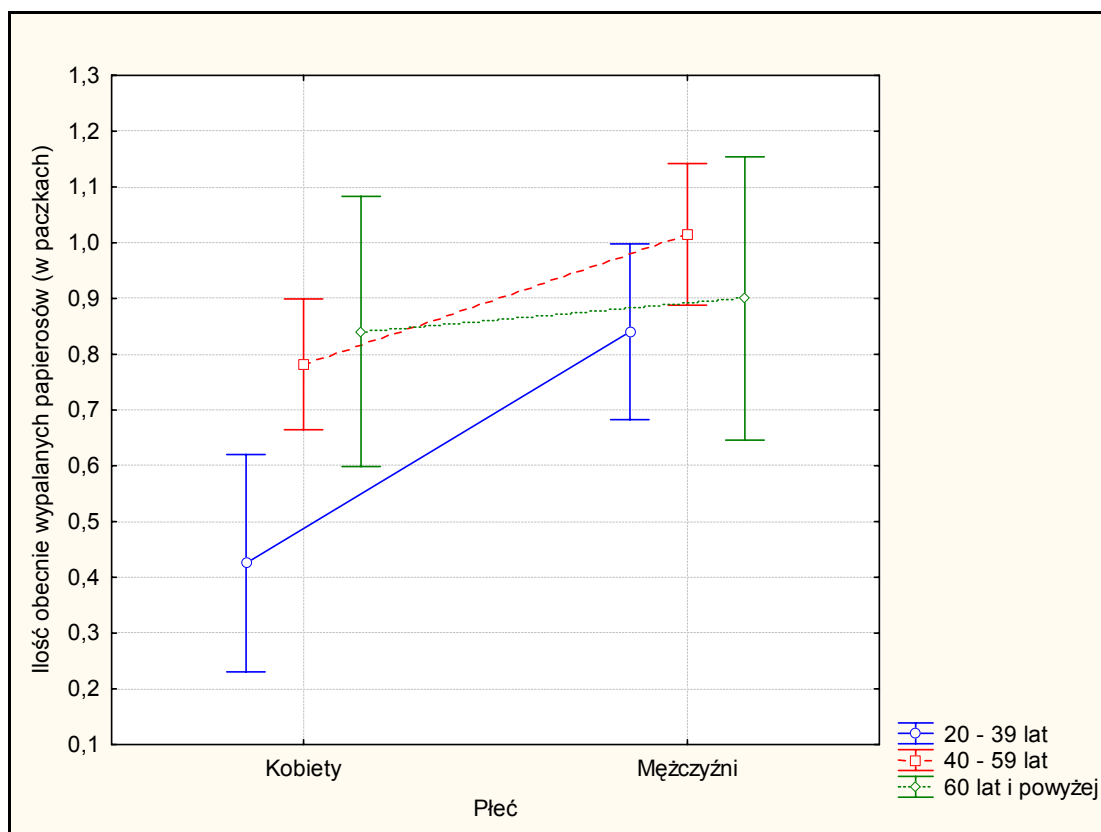
Tabela 8.
Odsetki osób palących tytoń obecnie, w przeszłości lub nigdy niepalących wśród kobiet i mężczyzn.

Płeć	Palenie tytoniu (%)		
	Nigdy	Obecnie	W przeszłości
Mężczyźni	93 (16,91)	77 (14,00)	78 (14,18)
Kobiety	167 (30,36)	75 (13,64)	60 (10,91)
Łącznie	260 (47,27)	152 (27,64)	138 (25,09)

Zaobserwowane różnice w liczebnościach osób nigdy niepalących, palących obecnie i w przeszłości pomiędzy grupą mężczyzn i kobiet są statystycznie istotne ($\chi^2 = 18,9$; $df = 2$; $p = 0,0001$). Największe różnice są widoczne w odsetku osób nigdy niepalących tytoniu – w porównaniu do mężczyzn, ponad dwukrotnie więcej kobiet nigdy nie zaczyna palić.

Wieloczynnikowa analiza wariancji wykazała, że zarówno płeć jak i przynależność do danej grupy wiekowej są niezależnymi czynnikami związanymi z ilością wypalanych papierosów ($p = 0,003$). Testem *post hoc* Tukey’a stwierdzono istotną różnicę pomiędzy grupą młodych kobiet (w wieku 20 – 39 lat), a mężczyznami niezależnie od wieku (poziomy istotności dla przedziału wiekowego 20 – 39; 40 – 59 oraz 60 i powyżej wyniosły odpowiednio: 0,014; <0,0001 oraz 0,04) oraz kobietami w wieku 40 – 59 lat ($p = 0,024$). Wyniki analizy przedstawiono na wykresie poniżej.

Wykres 4.
Średnia ilość wypalanych obecnie papierosów (w paczkach/dzień) z 95% przedziałem ufności w zależności od płci i przedziału wiekowego.



Odsetek obecnych palaczy był podobny w grupie kobiet i mężczyzn, niemniej mężczyźni wypalali dziennie znacznie więcej papierosów: 0,94 paczki (SD 0,41; zakres 3 – 40 papierosów) vs 0,71 (SD 0,44; zakres: 1 – 40 papierosów); $p = 0,001$. Także mężczyźni w porównaniu do kobiet zaczęli istotnie wcześniej palić tytoń: 18,59 lat (SD 3,64; zakres: 10-34) vs 20,98 lat (SD 5,16; zakres: 15-45), $p < 0,0001$; jak również średnia wartość paczkołat była większa w tej grupie: 26,70 (SD 22,29; zakres: 0,15 – 122,5) vs 18,31 (SD 20,97; zakres: 0,04 – 132), $p = 0,0012$.

Ośmiu uczestników (1,46%): 4 mężczyzn i 4 kobiety, zgłosiło występowanie POChP, stężenie AAT było u tych osób prawidłowe, średnia wieku wyniosła 59,25 lat (SD 9,39; zakres: 48 – 75). Dwadzieścia osób zgłosiło występowanie astmy oskrzelowej (3,64%): 10 mężczyzn i 10 kobiet, średnia wieku wyniosła w tym przypadku 44,6 lat (SD 19,36; zakres: 21 – 74). W tej grupie trzy osoby zgłosiły występowanie obu schorzeń. Po ich wykluczeniu z grupy uczestników zgłaszających przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, średnia wieku wyniosła 65,0 lat (SD 6,48; zakres: 59 – 76).

4.3. Stężenie AAT w surowicy

W modelu regresji wielokrotnej wartości stężenia AAT w surowicy uwzględniono podstawowe parametry laboratoryjne, oraz wiek, ciśnienie tętnicze krwi, BMI i ilość dziennie wypalanych papierosów. W obliczeniach uwzględniono jedynie osoby z prawidłowym genotypem AAT (nie-S, nie-Z). Stężenie AAT najsilniej zależy od ilości wypalanych dziennie papierosów, a także od BMI, oraz liczby leukocytów i płytek krwi. Przedstawiony model wyjaśnia jednak tylko ok. 19% zmienności stężenia AAT ($r^2 = 18,7$).

Tabela 9.
Współczynniki modelu regresji wielokrotnej wartości stężenia AAT w surowicy.

Cecha	Współczynnik β	Błąd standardowy	Istotność statystyczna
Ilość wypalanych papierosów	0,16518	0,045943	0,000357
BMI (kg/m ²)	-0,15693	0,047845	0,001113
Leukocyty (tyś./ μ l)	0,15463	0,050991	0,002556
Płytki krwi (tyś./ μ l)	0,10146	0,046202	0,028557
Hematokryt (%)	2,66694	1,509940	0,077981
Hemoglobina (g/dl)	-2,68892	1,569405	0,087288
Cholesterol LDL (mmol/l)	-0,37093	0,291419	0,203683
Cholesterol HDL (mmol/l)	0,32513	0,284200	0,253184
MCV (fl)	-1,17330	1,026359	0,253534
Neutrofile (%)	1,74624	1,561435	0,263969
Inne: Bazo, Eo, Mono (%)	0,59721	0,564816	0,290878
MCH (pg)	1,11517	1,070305	0,297970
Limfocyty (%)	1,38895	1,384563	0,316280
Rozkurczowe (mm Hg)	-0,06312	0,065166	0,333220
Trójglicerydy (mmol/l)	0,04039	0,051370	0,432134
Wiek (lat)	0,03992	0,053509	0,455996
Erytrocyty (mln/ μ l)	-0,32068	0,645986	0,619818
Cholesterol całkowity (mmol/l)	-0,02586	0,069316	0,709208
Skurczowe (mm Hg)	0,01914	0,068105	0,778774

Cecha	Współczynnik β	Błąd standardowy	Istotność statystyczna
MCHC (g/dl)	0,12797	0,512389	0,802890

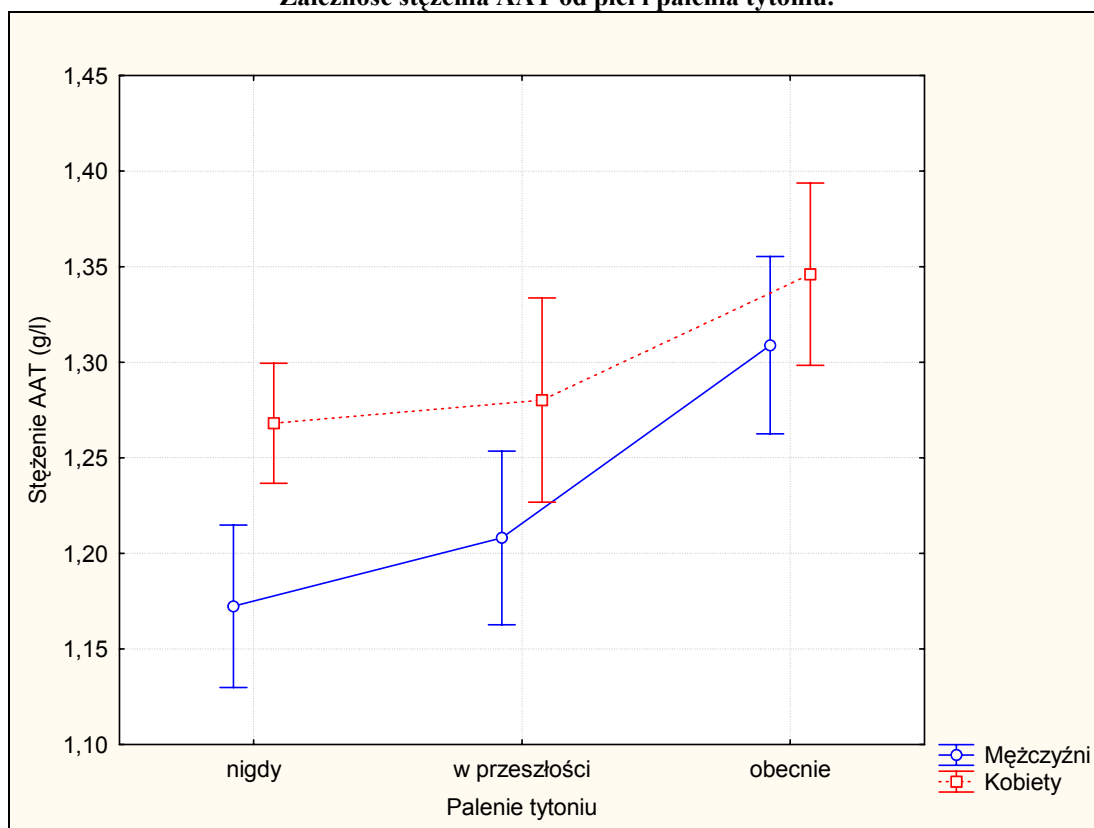
Płeć i palenie papierosów stanowią niezależne czynniki wpływające na stężenie AAT w surowicy (odpowiednio: $p = 0,0003$ i $<0,0001$). Ogólnie rzecz biorąc, stężenie AAT w grupie mężczyzn jest niższe w porównaniu do kobiet, natomiast jest wyższe wśród osób obecnie palących tytoń.

Tabela 10.
Stężenie AAT w surowicy a palenie tytoniu i płeć.

Palenie tytoniu	Płeć	Stężenie AAT (g/l)	SD	95% przedział ufności	
Obecnie	Mężczyźni	1,31	0,21	1,26	1,36
	Kobiety	1,35	0,19	1,30	1,39
Łącznie		1,33	0,20	1,29	1,36
W przeszłości	Mężczyźni	1,21	0,20	1,16	1,25
	Kobiety	1,28	0,26	1,21	1,35
Łącznie		1,24	0,23	1,20	1,28
Nigdy	Mężczyźni	1,17	0,15	1,14	1,20
	Kobiety	1,27	0,20	1,24	1,30
Łącznie		1,23	0,19	1,21	1,26
Łącznie mężczyźni		1,23	0,20	1,20	1,25
Łącznie kobiety		1,29	0,21	1,26	1,31

Test *post hoc* Tukey'a wykazał znamienne różnice (wyższe stężenie AAT) pomiędzy grupą kobiet obecnie palących, a mężczyznami palącymi w przeszłości ($p = 0,0006$) lub nigdy ($p < 0,0001$). Także wśród nigdy niepalących mężczyzn stężenie AAT jest znamienne niższe w porównaniu do obecnie palących ($p = 0,0003$) jak i kobiet nigdy niepalących ($p = 0,0050$) lub w przeszłości ($p = 0,0234$). Również mężczyźni obecnie palący różnią się od palących w przeszłości przy ocenie stężenia AAT ($p = 0,0277$). Średni czas od zaprzestania palenia wyniósł 11,93 lat (SD 9,85; zakres: 0,25 – 45).

Wykres 5.
Zależność stężenia AAT od płci i palenia tytoniu.

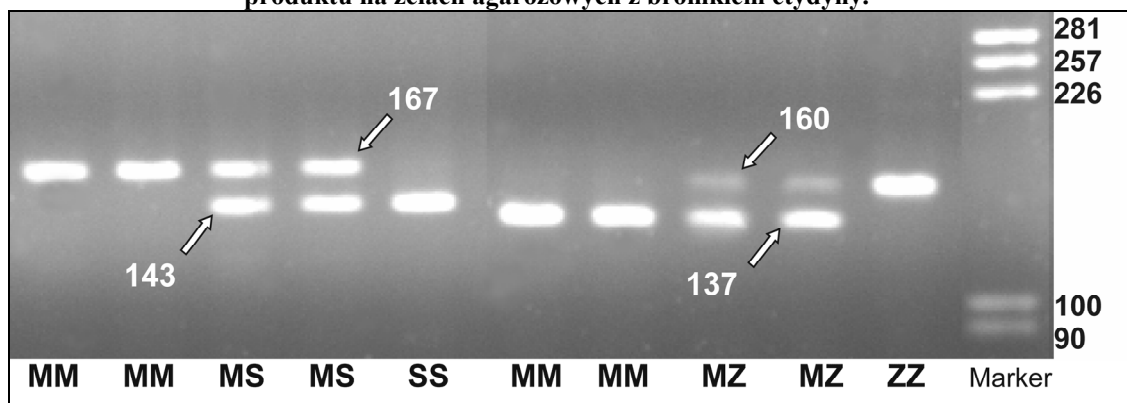


4.4. Genotypowanie niedoborów AAT metodą analizy miejsc restrykcyjnych

Tą technikę genotypowania opracowano w pierwszej kolejności i poddano walidacji zewnętrznej (próbki wzorcowe) celem potwierdzenia wiarygodności otrzymanych wyników. Posłużyła ona następnie jako metoda referencyjna przy optymalizacji i walidacji *real-time* PCR. Próbkę poddawano amplifikacji, a następnie trawieniu obrazowano dwoma sposobami, przy czym w większości przypadków, ze względu na łatwość odczytu i zautomatyzowanie procesu, zastosowano odczyt fluorymetryczny żelów poliakrylamidowych.

Poniżej przedstawiono obraz żelu agarozowego z bromkiem etydyny, pięć pierwszych próbek to diagnostyka mutacji S – produkt amplifikacji ulega trawieniu w przypadku występowania mutacji, kolejnych pięć – wykrywanie allele Z, w tym wypadku wystąpienie mutacji znosi miejsce restrykcyjne i ampikon nie ulega trawieniu. Na rycinie przedstawiono poszczególne genotypy, jako marker wielkości DNA zastosowano pBR322 DNA/*AluI*.

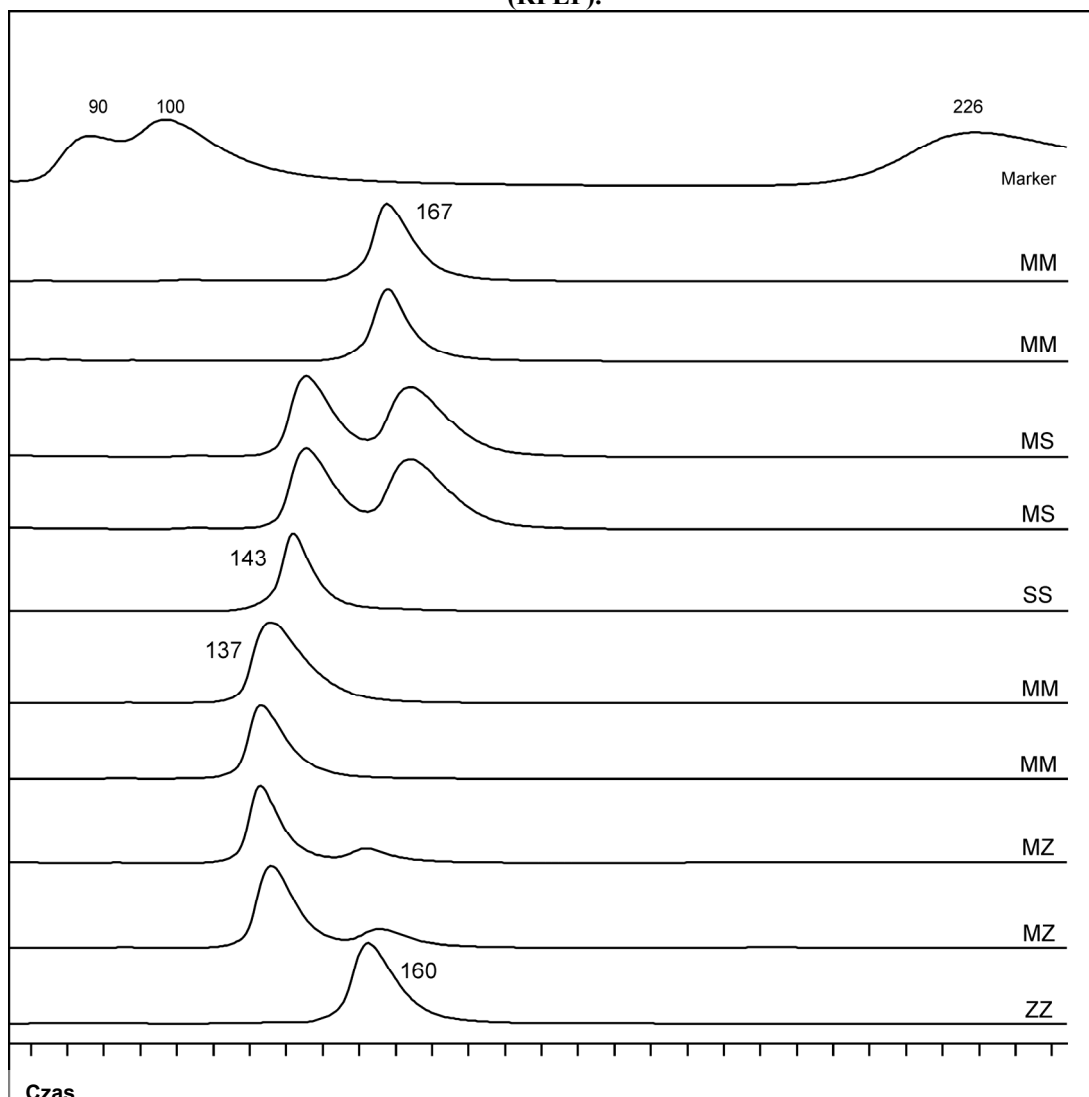
Rycina 28.
Wyniki genotypowania metodą analizy miejsc restrykcyjnych (RFLP) i obrazowaniem produktu na żelach agarozowych z bromkiem etydy.



Jak wspomniano w większości przypadków obrazowanie produktu trawienia przeprowadzano systemem zautomatyzowanej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Poniżej na rycinie przedstawiono przykładowy fluorogram, opis próbek i wyników jest podobny jak w przypadku żelów agarozowych. Jak można zauważyć w obu technikach obrazowania, w przypadku detekcji allela PI*Z występuje pewna nierównomierność wielkości prążków/„pików”, nie zaburzającą jednak w istotnym stopniu wiarygodności interpretacji wyników.

Metodą analizy miejsc restrykcyjnych potwierdzano wyniki genotypowania uzyskane diagnostyką *real-time* PCR: (i) w każdym przypadku stwierdzenia występowania alleli niedoborowych; (ii) w losowo wybranej grupie próbek o prawidłowym genotypie; a także, zwłaszcza na początkowym etapie optymalizacji opracowywanej metody, (iii) w przypadku wyników wątpliwych (np. o słabej amplifikacji). Potwierdzenie wyników *real-time* PCR w trakcie genotypowania losowej próby populacyjnej ($n = 550$) przeprowadzono łącznie w 71 przypadkach (13%) diagnostyki allela S oraz 131 (24%) przy detekcji allela Z. We wszystkich przypadkach uzyskano 100% zgodność pomiędzy metodami.

Rycina 29.
Fluorogram obrazujący wyniki genotypowania AAT metoda analizy miejsc restrykcyjnych (RFLP).



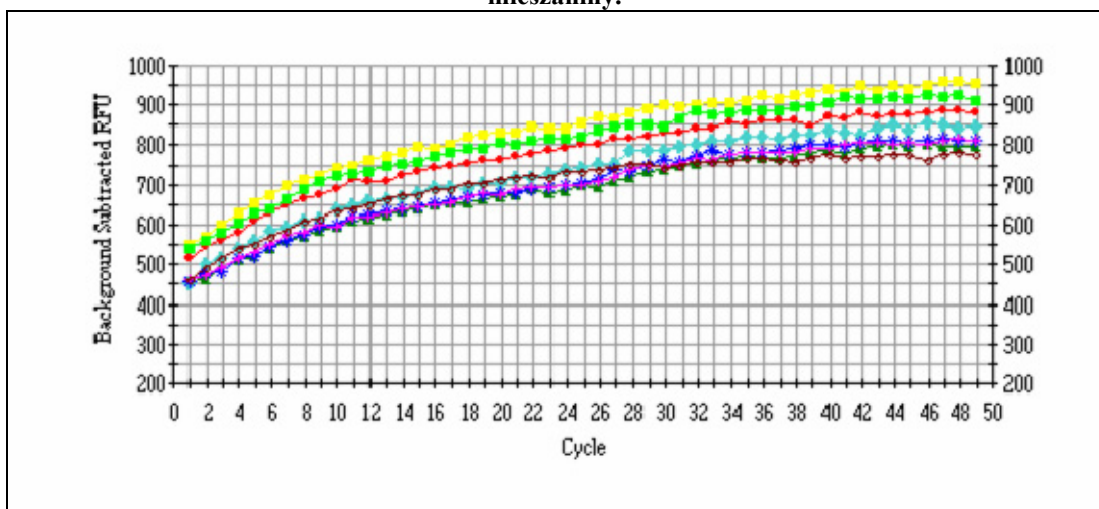
4.5. Genotypowanie niedoborów AAT metodą amplifikacji DNA z użyciem pary sond podwójnie znakowanych fluorescencyjnie i detekcją produktu w czasie reakcji – real-time PCR

Początkowo zestaw podwójnie znakowanych oligonukleotydów służących do wykrywania mutacji S został zaprojektowany podobnie jak w przypadku diagnostyki allela PI*Z, to znaczy, obydwie sondy różniły się jedynie jednym nukleotydem. Niemniej, sonda specyficzna dla allela „dzikiego” o sekwencji 5’-[ROX]-ATA TCG TGG GTG AGT TCA TTT TCC A-[Black Hole Quencher 2], znakowana fluorochromem ROX, wykazywała niestabilność termiczną dołączonego barwnika. Prowadziło to do niespecyficznego przyrostu fluorescencji już od pierwszych cykli

amplifikacji. Zjawisko to występowało nawet bez dodania polimerazy do mieszaniny reakcyjnej.

Wykres 6.

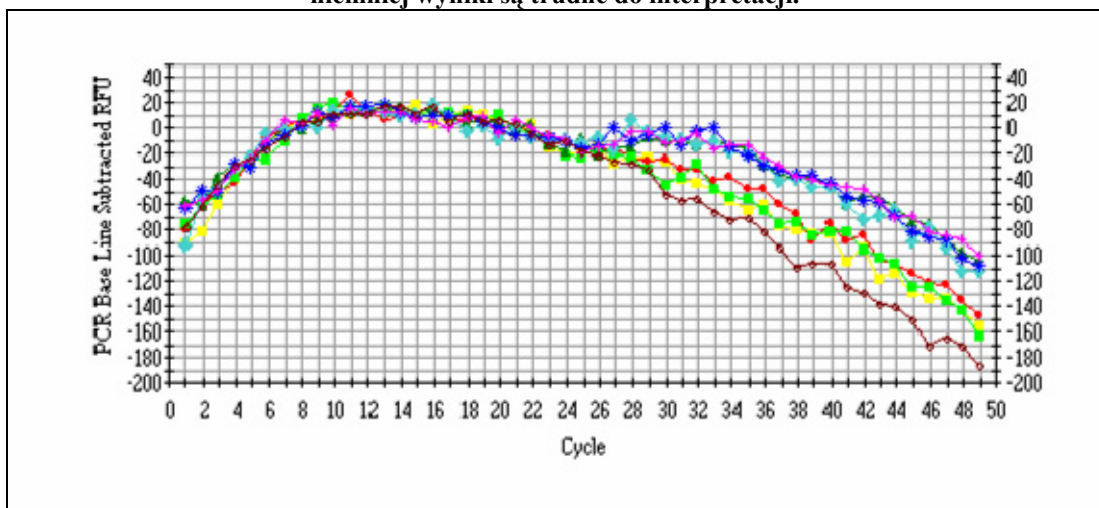
Niestabilność termiczna sondy specyficznej dla allele „dzikiego” w zestawie do wykrywania mutacji S, obserwowana od pierwszych cykli reakcji, nawet bez dodania polimerazy do mieszaniny.



Sonda ta wykazywała pewną specyficzność, niemniej wyniki były trudne do interpretacji. Ponieważ za pomocą sondy otrzymanej w wyniku reklamacji i ponownej syntezy nie uzyskano znaczącej poprawy obserwowanych parametrów, zdecydowano się na przeprojektowanie tego oligonukleotydu. Nowa sonda została przesunięta o trzy nukleotydy w górę nici DNA i skrócona o 3 nukleotydy, celem dobrania odpowiedniej temperatury topnienia w zestawie. Nie wpłynęło to na specyficzność reakcji w porównaniu do sondy dla allele niedoborowego, natomiast nie obserwowano już niestabilności termicznej dołączonego barwnika.

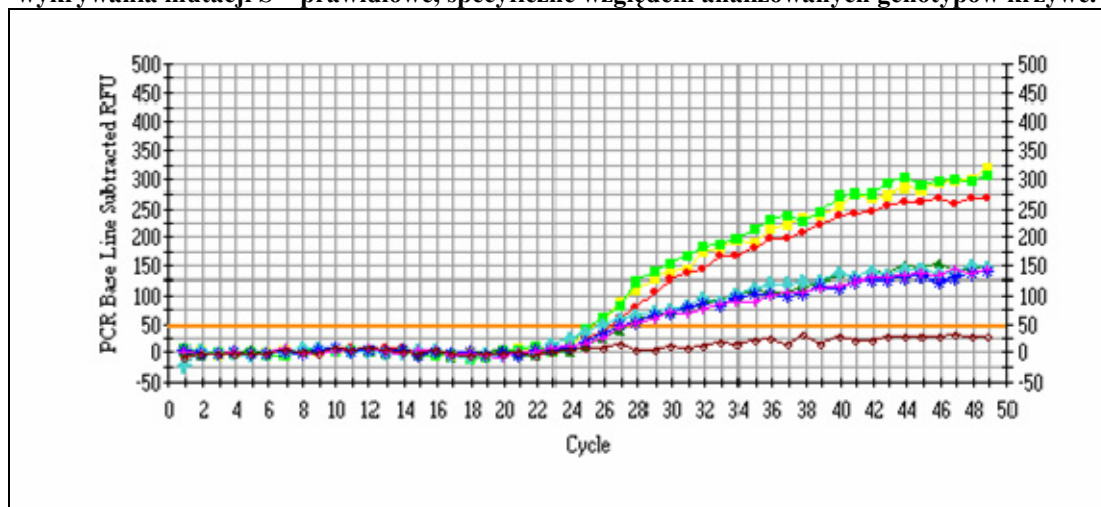
Wykres 7.

Sonda dla allele „dzikiego” w zestawie do wykrywania mutacji S wykazuje pewną specyficzność, niemniej wyniki są trudne do interpretacji.



Wykres 8.

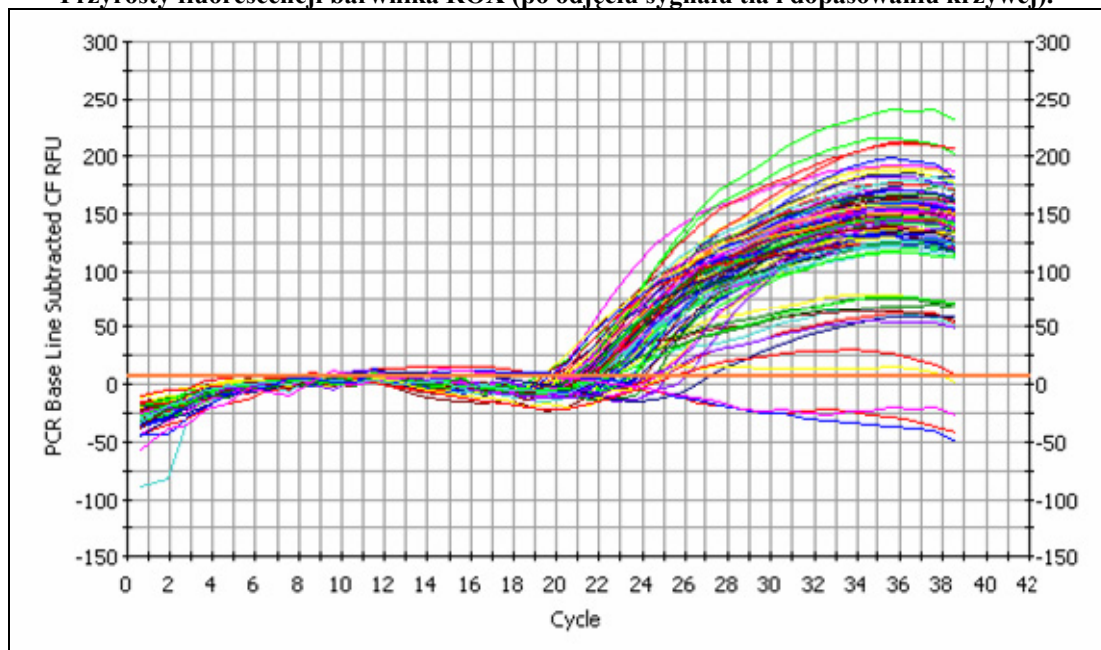
Przyrosty fluorescencji dla sondy specyficznej dla allele niedoborowego w zestawie do wykrywania mutacji S – prawidłowe, specyficzne względem analizowanych genotypów krzywe.



Poniżej przedstawiono sposób interpretacji wyników *real-time* PCR. Jak wspomniano, sonda specyficzna względem allele dzikiego była wyznakowana barwnikiem ROX, poniżej przedstawiono przyrosty fluorescencji względnej (RFU – *relative fluorescence units*) w poszczególnych cyklach reakcji amplifikacji, po odjęciu sygnału tła i dopasowaniu krzywej (CF – *curve fit*).

Wykres 9.

Przyrosty fluorescencji barwnika ROX (po odjęciu sygnału tła i dopasowaniu krzywej).

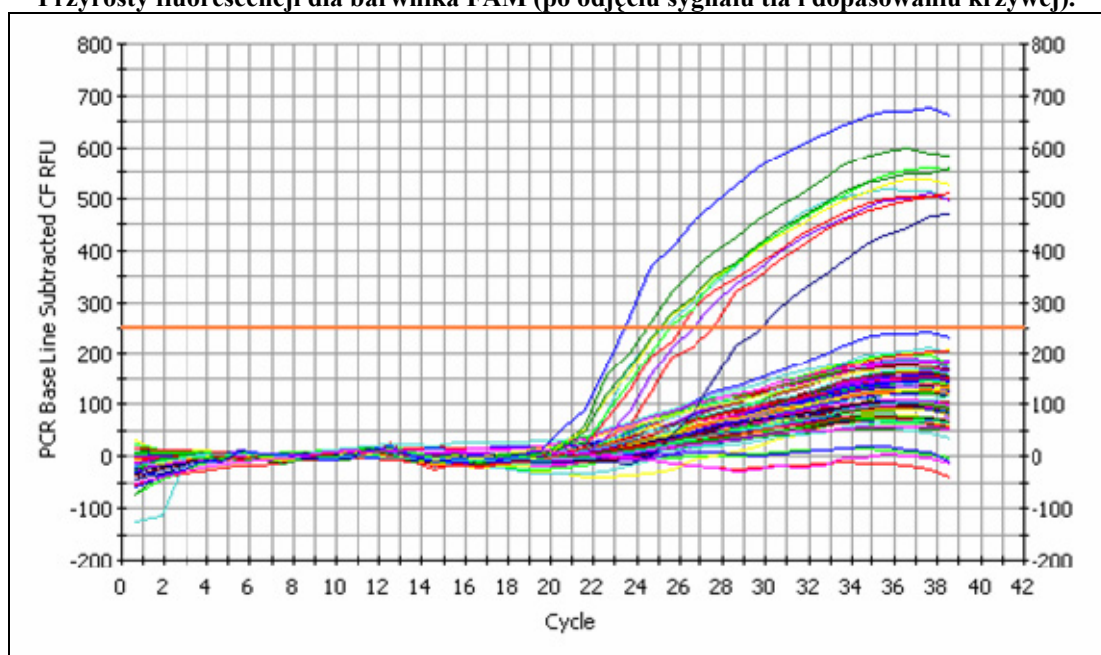


W większości próbek doszło do znacznego wzrostu fluorescencji, świadczącego o hybrydyzacji znakowanej sondy do matrycowego DNA, strawieniu jej przez polimerazę i odłączeniu barwnika – są to najprawdopodobniej homozygoty prawidłowe. W dziewięciu próbkach, stanowiących oddzielną grupę, doszło do

pośredniego przyrostu fluorescencji – przypuszczalnie heterozygoty. W przypadku 3 próbek nie zaobserwowano żadnego przyrostu fluorescencji (linie horyzontalne) – 2 „ślepe” i jedna dodatnia kontrola (homozygota niedoborowa).

Na wykresie fluorescencji barwnika FAM (znakującego sondę dla allele zmutowanego) obserwujemy znaczący przyrost w 10 próbkach: najwyższa linia krzywa – to najprawdopodobniej homozygota zmutowana, następna grupa 9 próbek o pośrednim wzroście fluorescencji – heterozygoty. W pozostałych próbkach, gdzie nie doszło do hybrydyzacji sondy specyficznej względem allele zmutowanego, obserwowane są jedynie niespecyficzne przyrosty w ostatnich cyklach amplifikacji – homozygoty „dzikie”. W opracowanym układzie sonda dla allele prawidłowego charakteryzuje się wyższą swoistością, natomiast dla zmutowanego – wyższą czułością.

Wykres 10.
Przyrosty fluorescencji dla barwnika FAM (po odjęciu sygnału tła i dopasowaniu krzywej).

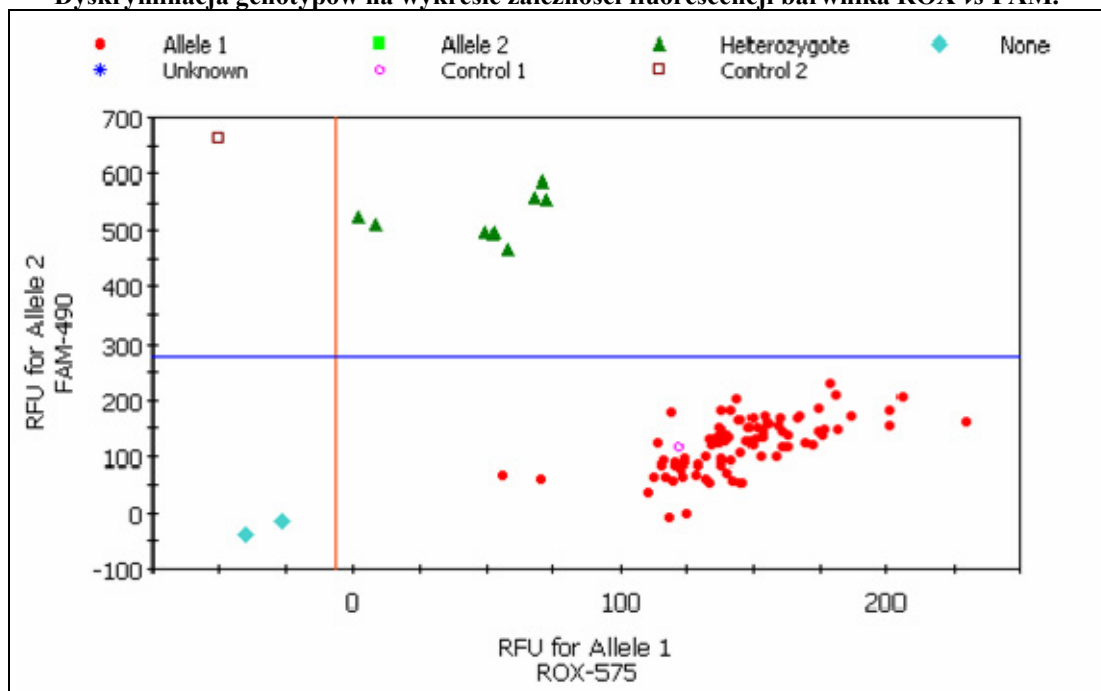


Ostateczny odczyt genotypów przeprowadzano na wykresie zależności fluorescencji barwnika ROX od FAM dla poszczególnych próbek. Widoczna jest duża grupa próbek o znacznym wzroście fluorescencji w zakresie jedynie barwnika ROX, które stanowią homozygoty prawidłowe (różowe kółko w tej chmurze próbek to dodatnia kontrola – homozygota M). Druga grupa to próbki o pośrednim sygnale w zakresie barwnika ROX i FAM – heterozygoty. Tylko w jednym przypadku zaobserwowano silny sygnał jedynie dla FAM – homozygota zmutowana (S lub Z w zależności od reakcji), stanowiąca w tym przypadku dodatnią kontrolę. Ostatnią

grupę stanowią dwie próbki bez wzrostu fluorescencji w zakresie obu barwników – „ślepe” kontrole.

Wykres 11.

Dyskryminacja genotypów na wykresie zależności fluorescencji barwnika ROX vs FAM.



Opracowana metoda została poddana walidacji wewnętrznej (za pomocą metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) oraz zewnętrznej w ośrodku kontroli międzylaboratoryjnej (Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Referenzinstitut für Bioanalytik, Im Mühlenbach 52a, D-53127 Bonn, Germany).

4.6. Częstości występowania alleli niedoborowych *PI*S* i *PI*Z* w losowej próbie populacji Krakowa

W populacji 550 osób stanowiących zebrana losową próbę populacyjną spośród mieszkańców miasta Krakowa zdiagnozowano 17 heterozygot MS, 12 – MZ i jedną homozygotę S. Częstość występowania allela S wynosi zatem 1,73% (95% CI: 1,09 – 2,55), natomiast allela Z – 1,09% (95% CI: 0,45 – 1,82). Opracowane metody genetyczne wykorzystano także do genotypowania wcześniej zebranej próby populacyjnej spośród mieszkańców jednej z dzielnic Krakowa – Kazimierza (łącznie 309 osób), której próbki DNA zostały zabezpieczone w naszym laboratorium. Ponieważ nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy populacjami w częstości występowania alleli niedoborowych, celem zwiększenia wiarygodności oszacowania połączono obie populacje, co daje łączną liczebność 859 osób.

Tabela 11.
Liczebności zdiagnozowanych genotypów wśród zebranej próby populacyjnej (n = 550) oraz
połączonej populacji (n = 859).

Liczba osób	MM (nie S, nie-Z)	MS	MZ	SZ	SS	ZZ
550	520	17	12	0	1	0
859	812	28	18	0	1	0

W tej łącznej grupie stwierdzono 28 heterozygot MS, 18 – MZ oraz jedną homozygotę S. Częstości alleliczne wynoszą zatem: S – 1,75% (95% CI: 1,18 – 2,48) oraz Z – 1,05% (95% CI: 0,62 – 1,65).

W przypadkach obu populacji wykazano zgodność obserwowanych częstości genotypów z oczekiwanymi na podstawie równowagi Hardy’ego – Weinberga (odpowiednio: $p = 0,199$ i $0,466$). Występowanie niedoborów nie było związane z płcią ($p = 0,36$).

Tabela 12.
Częstości alleli AAT w losowej próbie populacji mieszkańców Krakowa (n = 859) wraz z 95%
przedziałem ufności

Allel	Częstość	Błąd standardowy	95% dolny przedział ufności	95% górny przedział ufności
M (nie S, nie-Z)	0,9721	0,0040	0,9639	0,9796
S	0,0175	0,0032	0,0111	0,0244
Z	0,0105	0,0024	0,0058	0,0157

W tabeli poniżej przedstawiono częstości zdiagnozowanych genotypów w losowej próbie populacji Krakowa.

Tabela 13.
Częstości genotypów AAT w losowej próbie populacji Krakowa (n = 859).

Genotyp	Częstość	Błąd standardowy
MM (nie S, nie-Z)	0,9453	0,0011
MS	0,0326	0,0011
MZ	0,0210	0,0001
MM	0,0012	0,0011

4.7. Oczekiwane liczebności genotypów AAT

Na podstawie częstości allelicznych otrzymanych w wyniku analizy losowej próby populacyjnej (n = 859) oraz prawa Hardy’ego-Weinberga oszacowano liczebności poszczególnych genotypów AAT w populacji mieszkańców miasta Krakowa oraz Polski. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

Tabela 14.
Oczekiwane liczebności genotypów AAT w populacji mieszkańców miasta Krakowa⁷.

Genotyp	Liczebność	95% dolny przedział ufności	95% górny przedział ufności
MM (nie S, nie-Z)	716 011	704 039	727 161
MS	25 725	16 215	36 224
MZ	15 435	8 473	23 308
SZ	227	98	581
SS	231	93	451
ZZ	83	25	187

⁷ W przeliczeniu na populację Krakowa wynoszącą 757 762 mieszkańców, stan na dzień 30 czerwca 2005 r.; źródło GUS.

W populacji Krakowa, wynoszącej 757 762 mieszkańców, można oczekiwać 83 (95% CI: 25 – 187) osób z ciężkim niedoborem AAT (homozygoty Z) oraz 41 618 (95% CI: 24 879 – 60 564) przypadków deficytów częściowych (MS, MZ, SZ i SS).

Tabela 15.
Oczekiwane liczebności genotypów AAT w populacji Polski⁸.

Genotyp	Liczebność	95% dolny przedział ufności	95% górny przedział ufności
MM	36 058 689	35 455 798	36 620 213
MS	1 295 522	816 598	1 824 282
MZ	777 313	426 691	1 173 821
SZ	13 964	4 914	29 238
SS	11 636	7 702	22 720
ZZ	4 189	1 284	9 406

W skali całego kraju, przy populacji Polski wynoszącej 38 161 313 osób, można natomiast oczekiwać 4 189 (95% CI: 1 284 – 9 406) osób z niedoborem ciężkim i 2 098 435 (95% CI: 1 255 905 – 3 050 061) przypadków deficytów częściowych, w tym 25 600 (95% CI: 12 616 – 51 958) osób z genotypem SZ i SS, o znacznie obniżonym stężeniu AAT, w przypadku których dodatkowe narażenie na czynniki środowiskowe (palenie tytoniu, narażenie zawodowe) może istotnie zwiększać ryzyko rozwoju objawów klinicznych.

Obliczona dla populacji Krakowa częstość występowania ciężkiego niedoboru AAT wynosi 1/9110 osób (95% CI: 1/4 057 – 1/29 727), natomiast dla deficytów częściowych: 1/3 279 (95% CI: 1/1 680 – 1/8 116). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

⁸ W przeliczeniu na populację Polski wynoszącą 38 161 313 osób, stan na dzień 30 czerwca 2005 r.; źródło GUS.

Tabela 16.
Prewalencja występowania poszczególnych genotypów niedoborowych.

Genotyp	Prewalencja 1/x	95% przedział ufności 1/x	
MS	29	21	47
MZ	49	33	89
SZ	2 733	1 305	7 766
SS	3 279	1 680	8 116
ZZ	9 110	4 057	29 727

4.8. Zależność stężenia AAT od genotypu

Dla poszczególnych genotypów obliczono średnie wartości stężenia AAT w surowicy, otrzymane metodą nefelometryczną (wartości prawidłowe: 0,9 – 2,0 g/l). W grupie osób z prawidłowym genotypem (nie-S, nie-Z) wartość ta wynosi 1,26 g/l (SD 0,21; zakres: 0,85 – 2,51), w przypadku heterozygot MS – 1,09 g/l (SD 0,14; zakres: 0,84 – 1,33) co stanowi 86% wartości stężenia w grupie prawidłowej, natomiast dla heterozygot MZ – 0,76 g/l (SD 0,06; zakres: 0,66 – 0,85), zatem 60% wartości w grupie „nie-S, nie-Z”. Tylko w 1 przypadku stwierdzono występowanie homozygotyczności S, stężenie AAT wyniosło 0,78 g/l (62% wartości w grupie prawidłowej).

Tabela 17.
Średnie wartości stężenia AAT w surowicy w zależności od zdiagnozowanego genotypu.

Genotyp	Średnia (g/l)	SD	95% przedział ufności		Mediana	Minimum	Maksimum
MM	1,261	0,208	1,243	1,279	1,23	0,85	2,51
MS	1,088	0,145	1,013	1,162	1,08	0,84	1,33
MZ	0,762	0,058	0,725	0,799	0,77	0,66	0,85
SS	0,78	-	-	-	0,78	-	-

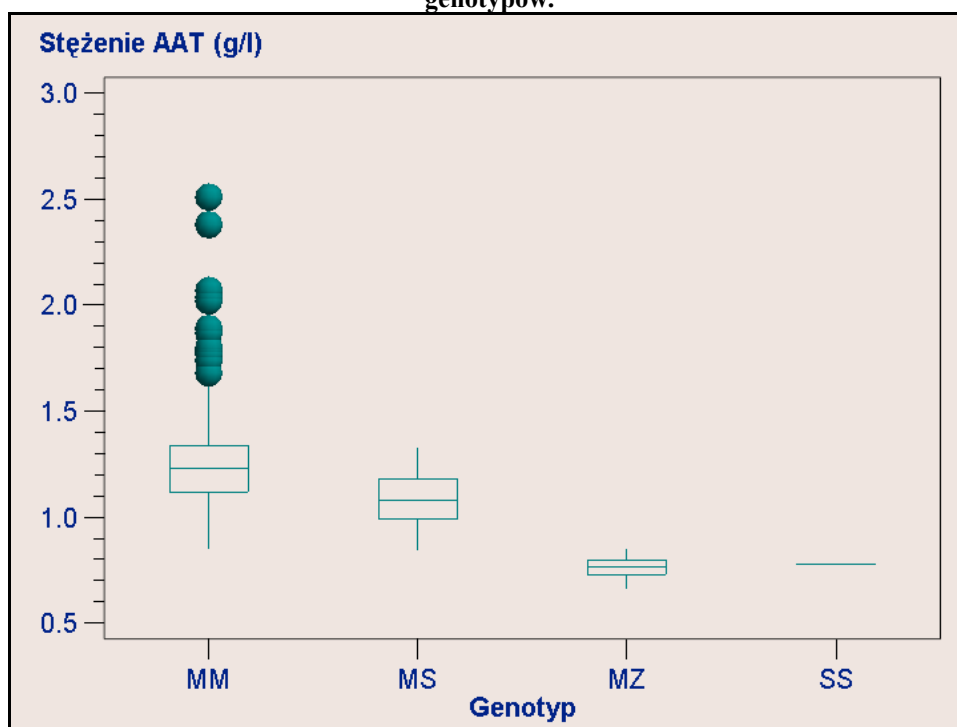
Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne statystycznie różnice w średnich wartościach stężenia AAT pomiędzy osobami z genotypem prawidłowym a

heterozygotami MS – stężenie niższe o średnio o 14%, tj. 0,173 g/l (95% CI: 0,043 – 0,303), oraz heterozygotami MZ – różnica 40%, czyli 0,499 g/l (95% CI: 0,345 – 0,653). Znamienne różnice stwierdzono także pomiędzy grupą heterozygot MS a MZ – stężenie AAT niższe w tej drugiej grupie o 30%, tj. 0,362 g/l (95% CI: 0,127 – 0,525).

Tabela 18.
Różnica w średnim stężeniu AAT w surowicy pomiędzy poszczególnymi genotypami.

Genotyp	Różnica pomiędzy średnimi (g/l)	95 % przedział ufności		Istotność statystyczna
MM - MS	0,173	0,043	0,303	0,0034
MM - SS	0,481	-0,048	1,009	0,0878
MM - MZ	0,499	0,345	0,653	<0,0001
MS - SS	0,308	-0,235	0,851	0,4614
MS - MZ	0,326	0,127	0,525	0,0001
SS - MZ	0,018	-0,531	0,568	0,9998

Rycina 30.
Średnie stężenie AAT w surowicy i odchylenie standardowe w przypadku poszczególnych genotypów.



Różnice występowały także pomiędzy grupą prawidłową a homozygotami S – stężenie niższe o 0,481 g/l (38%) oraz między heterozygotami MS a homozygotami

S – 0,308 g/l (28%). W żadnym przypadku wynik nie był znamieny statystycznie, niemniej należy mieć na uwadze, że stwierdzono tylko jedną homozygotę S.

4.9. Skuteczność diagnostyczna pomiaru stężenia AAT w wykrywaniu niedoborów częściowych (MZ, MS, SS)

Celem określenia skuteczności diagnostycznej nefelometrycznego pomiaru stężenia białka w surowicy w wykrywaniu występowania alleli niedoborowych PI*S i PI*Z, dla zakresu normy 0,9 – 2,0 g/l ustalono ilość wyników prawdziwie dodatnich (TP), prawdziwie ujemnych (TN), fałszywie dodatnich (FP) i fałszywie ujemnych (FN), stosując jako metodę referencyjną techniki genotypowania. Analizę przeprowadzono w obrębie losowej próby populacyjnej (n = 550), z tego względu, że tylko dla tej kohorty wykonano oznaczenia stężenia AAT w surowicy.

Tabela 19.

Wyniki prawdziwie dodatnie (TP), fałszywie dodatnie (FP), fałszywie ujemne (FN) i prawdziwie ujemne (TN) przy zastosowaniu pomiaru stężenia białka AAT w diagnostyce niedoborów częściowych.

Wynik pomiaru nefelometrycznego	Allel S lub Z obecne	Allel S i Z nieobecne	Łącznie
Test dodatni (< 0,9 g/l)	14 (TP)	5 (FP)	19
Test ujemny ($\geq$ 0,9 g/l)	16 (FN)	515 (TN)	531
Łącznie	30	520	550

W tabeli poniżej przedstawiono wyniki parametrów charakteryzujących skuteczność diagnostyczną ocenianego testu w wykrywaniu dwóch alleli niedoborowych AAT.

Tabela 20.

Parametry charakteryzujące skuteczność diagnostyczną pomiaru stężenia AAT w surowicy w wykrywaniu niedoborów częściowych.

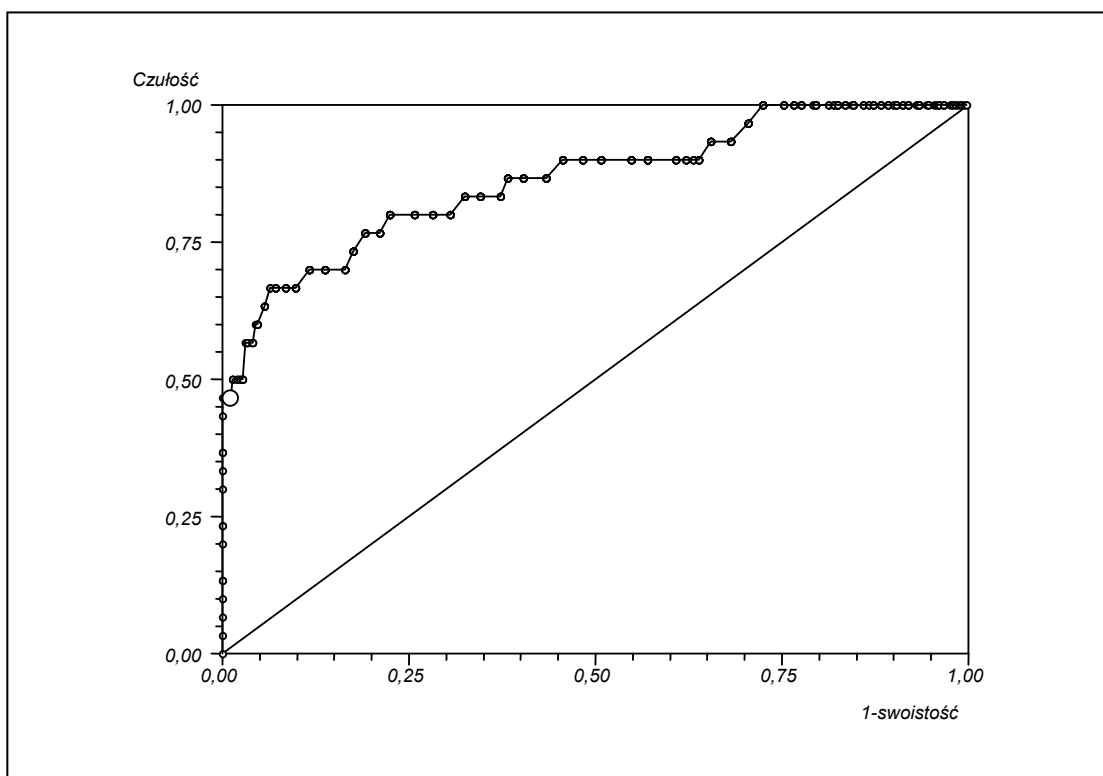
Parametr	Wartość	95% przedział ufności	
Czułość	46,67%	28,34%	65,67%
Swoistość	99,04%	97,77%	99,69%
Dokładność	96,18%	94,22%	97,62%
Wartość predykcyjna wyniku dodatniego	73,68%	48,8%	90,85%

Parametr	Wartość	95% przedział ufności	
Wartość predykcyjna wyniku ujemnego	96,99%	95,15%	98,27%
Wskaźnik wiarygodności wyniku dodatniego	48,53	19,15	121,27
Wskaźnik wiarygodności wyniku ujemnego	0,54	0,36	0,71
Diagnostyczny iloraz szans	86,88	25,89	347,53

Oceniana metoda diagnostyczna charakteryzuje się wysoką swoistością, czyli zdolnością do potwierdzania nieobecności deficytów częściowych (w 99% przypadków osób bez alleli niedoborowych PI*S i PI*Z test nie wskazuje na ich obecność), natomiast stosunkowo niską czułością (tylko w 47% przypadków z obecnością niedoborów częściowych test potwierdził ich występowanie). Dokładność diagnostyczna w wykrywaniu niedoborów częściowych AAT wynosi zatem 96%. Odsetek osób z dodatnim wynikiem testu, u których występują allele niedoborowe PI*S i PI*Z wynosi 74%, natomiast osób z ujemnym wynikiem testu, u których deficyty częściowe są nieobecne – 97%. Prawdopodobieństwo otrzymania dodatniego wyniku testu u osoby z chorobą jest 49 razy większe od tego prawdopodobieństwa u osoby bez choroby. Natomiast prawdopodobieństwo wyniku ujemnego u osoby chorej jest o około połowę mniejsze od prawdopodobieństwa otrzymania tego wyniku u osoby bez niedoborów częściowych.

Poniżej wykreślono krzywą ROC (*receiver operating characteristic*) dla punktu odcięcia 0,9 g/l. Pole pod krzywą oszacowane metodą Wilcozona wynosi 0,86 (95% CI: 0,58 – 1).

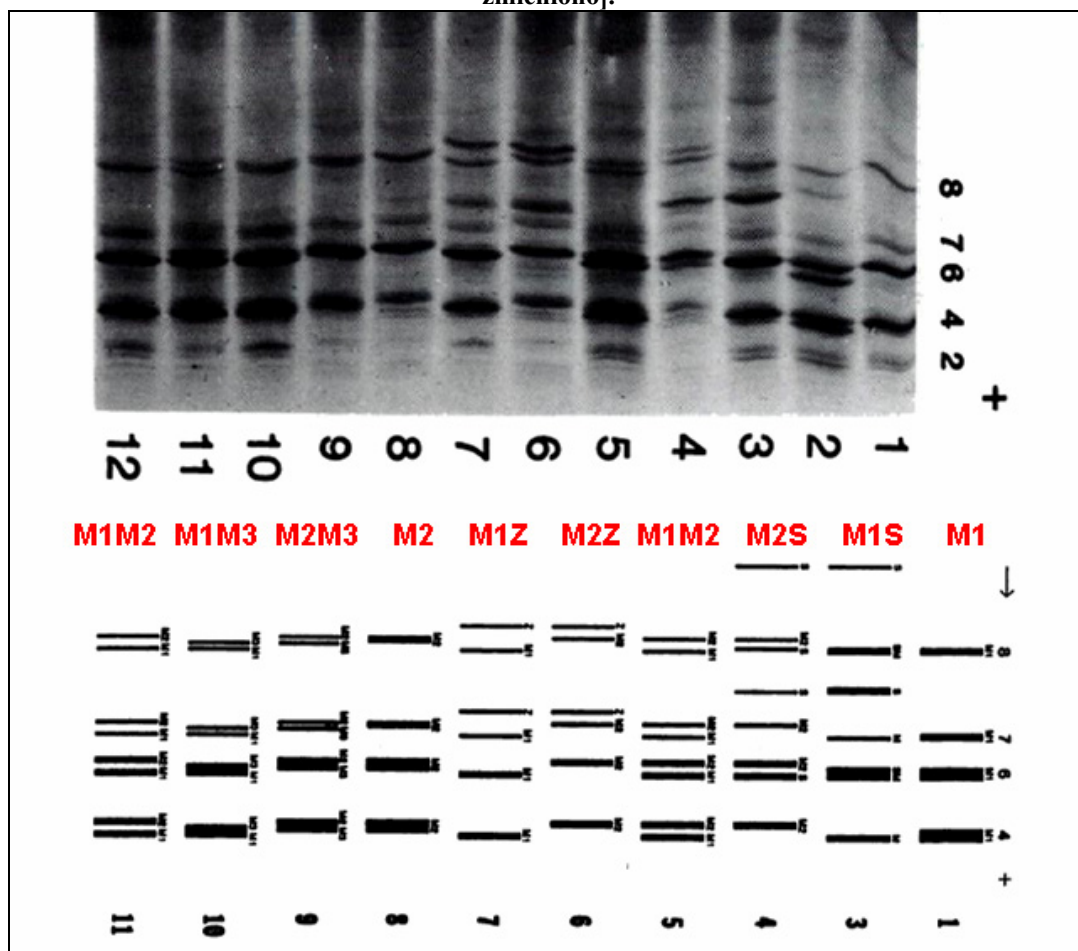
**Wykres 12.
Krzywa ROC.**



4.10. Ogniskowanie izoelektryczne AAT w żelach poliakrylamidowych

W przypadku próbek ($n = 5$), gdy nie zdiagnozowano występowania allela PI*S lub PI*Z (nie-S, nie-Z), natomiast stężenie AAT w surowicy było poniżej wartości prawidłowych (t.j. $< 0,9$ g/l) dodatkowo wykonano fenotypowanie AAT celem potwierdzenia otrzymanych wyników diagnostyki genetycznej, a także oceny występowania innych, rzadszych mutacji. W tym celu użyto zabezpieczoną od uczestników surowicę i wykonano ogniskowanie izoelektryczne białka w wąskim zakresie pH (4,2 – 4,9) w cienkich żelach poliakrylamidowych następnie srebrzonych, z zastosowaniem surowic wzorcowych dla podstawowych wariantów (M, S, Z).

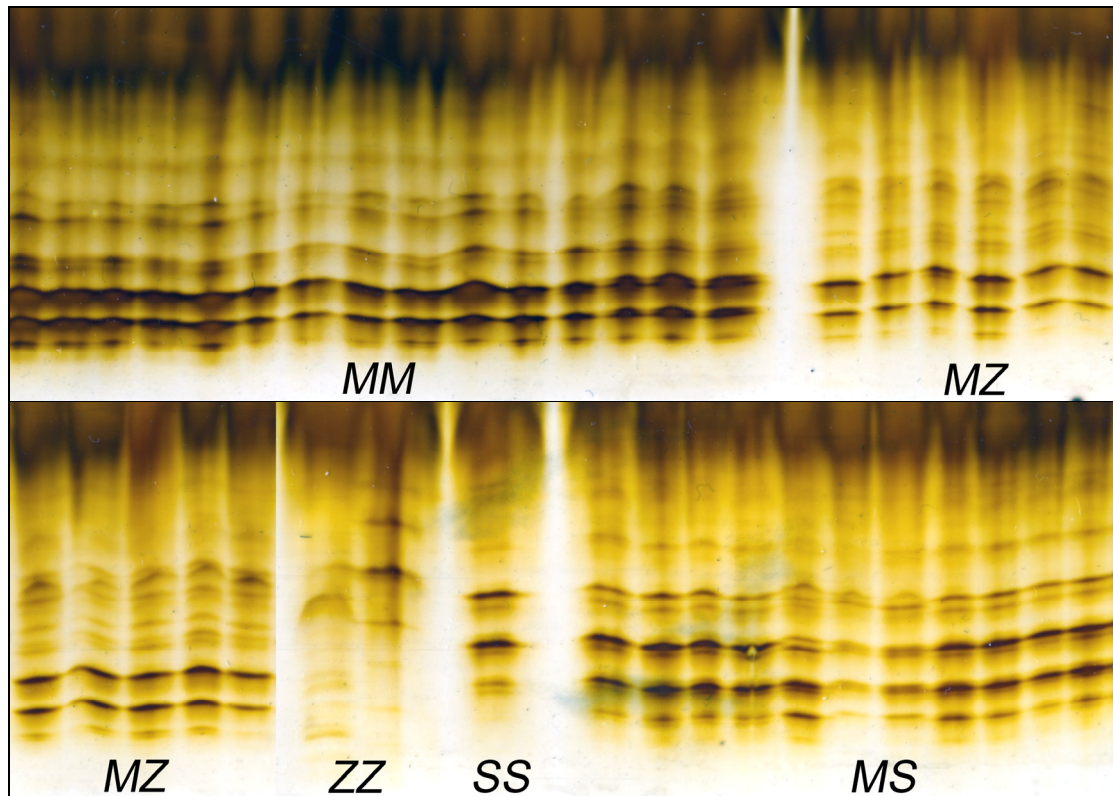
Rycina 31.
Fenotypowanie AAT za pomocą ogniskowania izoelektrycznego – wzór prążków [Za: (135);
zmieniono].



We wszystkich przypadkach potwierdzono brak występowania alleli niedoborowych PI*S i PI*Z. Nie stwierdzono także występowania innych wariantów (obraz prążków zgodny z wariantem M).

Rycina 32.

Wynik fenotypowania AAT metodą ogniskowania izoelektrycznego białka w wąskim zakresie pH (4,2 – 4,9) w żelach poliakrylamidowych następnie poddanych srebrzeniu.



5. DYSKUSJA

5.1. *Reprezentatywna próba populacyjna*

Niezbędnym warunkiem poprawności wnioskowania przy uogólnianiu wyników dotyczących analizowanej próby na populację, z której została ona pobrana, jest jej reprezentatywność. Najczęściej przez „reprezentatywność próby” rozumie się (146):

- Brak czynników selektywnych w doborze próby, prowadzących do systematycznych błędów stroniczości;
- Miniatura populacji, gdy rozkład wszystkich cech próby odpowiada rozkładowi w populacji;
- Przypadki typowe, gdzie pojęcie typowości cech próby polega na wysokiej częstotliwości ich występowania w populacji lub na bliskości ich wartości do średniej w populacji;
- Odwzorowanie różnorodności populacji, czyli włączenie do próby reprezentantów poszczególnych kategorii.

Zbiorowość próbna powinna z przyjętą dokładnością opisywać populację generalną, w tym przypadku mieszkańców Krakowa, lub nawet Polski. Wyboru grupy reprezentatywnej dokonano w sposób losowy, zatem każdy element zbiorowości mieszkańców Krakowa miał jednakowe prawdopodobieństwo znalezienia się w próbie. W takiej sytuacji jej reprezentatywność wzrasta wraz z liczebnością. W doborze próby przeprowadzono losowanie warstwowe, polegające na podzieleniu zbiorowości generalnej na rozłączne grupy, a następnie przeprowadzeniu losowania w obrębie każdej warstwy. Zapewnia to reprezentację każdej podgrupy, a ponadto zbiorowość generalna podzielona jest na podgrupy o większej homogenności, a zatem mniejszej wariancji niż populacja jako całość, co daje bardziej precyzyjne oszacowania (147).

Reprezentatywność dla całej populacji w przypadku niniejszej pracy jest w znacznym stopniu gwarantowana przez losowy dobór (przeprowadzony metodą komputerową) i stosunkowo znaczną liczebność. Źródłem błędu może być jednak: (i) włączenie jedynie osób dorosłych (w wieku 20 lat i powyżej), (ii) posiadających stałe zameldowanie na terenie miasta Krakowa oraz (iii) ograniczenie dzielnic miasta,

spośród których dokonywano losowania. Konieczność stałego zameldowania była uwarunkowana losowaniem przeprowadzonym przez Urząd Miasta spośród list meldunkowych. Na rekrutację jedynie osób dorosłych zdecydowano się chcąc uniknąć konieczności pobierania w przypadku niepełnoletnich zgody na udział w badaniu od rodziców lub opiekunów. Z kolei ograniczenie dzielnic było m.in. podyktowane obawą przed niską odpowiedzią w przypadku osób zamieszkujących w dużej odległości od miejsca rekrutacji, a także reprezentatywnością zamieszkujących je populacji w stosunku do całego miasta. Wybór dzielnic został dokonany po zasięgnięciu opinii krakowskich epidemiologów.

Reprezentatywność próby może być także ograniczona przez liczbę osób zgłaszających się do uczestnictwa w badaniu. Otrzymany w wyniku I etapu rekrutacji współczynnik odpowiedzi wyniósł 34,9% i był najniższy w grupie wiekowej 20 – 39 lat (21% dla mężczyzn i 28% dla kobiet). Celem zwiększenia odpowiedzi przeprowadzono II etap wysyłania zaproszeń do uczestnictwa w obrębie tej warstwy populacji, niemniej odpowiedź była stosunkowo niska (6,3%) przez co odstąpiono od dalszej rekrutacji. Ostatecznie współczynnik odpowiedzi wyniósł 36,7%. Spośród 1500 osób wylosowanych do uczestnictwa w badaniu zgłosiło się 550 mieszkańców Krakowa (248 mężczyzn i 302 kobiety). Zaobserwowane różnice w częstościach pomiędzy wylosowanymi a respondentami w grupach ze względu na płeć i wiek były istotne statystycznie. Ogólnie rozkład wieku wśród osób uczestniczących w badaniu był przesunięty w kierunku wyższych wartości w porównaniu do grupy wylosowanej, wśród mężczyzn różnice w średnim wieku pomiędzy tymi grupami osiągnęły istotność statystyczną. Niższa odpowiedź rejestrowana była wśród osób w wieku produkcyjnym i najprawdopodobniej spowodowana trudnościami związanymi z koniecznością zwolnienia się z pracy. Niestety, wymagania związane z wykonaniem badań laboratoryjnych i zabezpieczeniem pobranego materiału uwarunkowały przedpołudniowe godziny rekrutacji. Jest też prawdopodobne, że wyższa odpowiedź w starszej grupie wiekowej mogła być spowodowana wzrastającą wraz z wiekiem chorobowością i większym nastawieniem prozdrowotnym, chęcią wykonania badań kontrolnych i nawiązywania kontaktu ze służbą zdrowia. Mogło to teoretycznie zwiększać odpowiedź w grupie osób chorych, z objawami ze strony różnych narządów, w tym także spowodowanych niedoborem AAT i prowadzić do pewnego przeszacowania

częstości alleli niedoborowych. Niemniej badanie polegało na diagnostyce genetycznej, czyli ocenie materiału, który nie ulega zmianie wraz z wiekiem. Z drugiej strony do błędu przeszacowania mogłaby doprowadzić ewentualna nadumieralność homozygot PI*ZZ wzrastająca z wiekiem. Rzadkość takiego genotypu, nawet przy związanej z nim chorobowości, nie powinna jednak być powodem dużego błędu oszacowania, w którym o wyliczeniach częstości allele PI*Z zdecydowały liczebności heterozygot MZ.

Ponieważ w badaniu uczestniczyła tylko co trzecia wylosowana osoba, pojawiają się wspomniane zastrzeżenia odnośnie przenoszenia uzyskanych wyników na populację generalną. Należy mieć jednak na uwadze przy ocenie współczynnika odpowiedzi, że nie było to zwykłe badanie ankietowe, lecz uczestnictwo wymagało osobistego zgłoszenia się do kliniki i wyrażenia zgody na pobranie krwi. Ponadto dołożono wszelkich starań celem zwiększenia odpowiedzi (m.in. ogłoszenia w lokalnych mediach, wydawanie wyników badań laboratoryjnych). Uwzględniając te wszystkie aspekty można stwierdzić, że uzyskany odsetek zgłoszeń nie odbiega od uzyskiwanych w innych, podobnych badaniach populacyjnych. Uzyskany współczynnik odpowiedzi na poziomie 36,7% można uznać za wystarczający dla reprezentatywności próby, uwzględniając także różnice w odpowiedzi w poszczególnych grupach wiekowych.

5.2. Genotypowanie AAT

Jednym z głównych celów niniejszej pracy było opracowanie metody genotypowania niedoborów AAT, a dokładniej dwóch najczęstszych alleli deficytowych, tj. PI*S i PI*Z. Ta metoda diagnostyczna powinna być szybka i stosunkowo tania, możliwa do zastosowania w badaniu dużych grup populacyjnych, a jednocześnie charakteryzująca się wysoką wiarygodnością i powtarzalnością, by następnie mogła być wykorzystana w powszechnej praktyce klinicznej. Technika z wyboru okazał się jakościowy *real-time* PCR, który dzięki uniknięciu konieczności obróbki postamplifikacyjnej produktu cechuje się stosunkowo niskim kosztem jednostkowego oznaczenia, oraz niską czaso- i pracochłonnością.

Jakościowy *real-time* PCR został wprowadzony do diagnostyki niedoborów AAT w późnych latach dziewięćdziesiątych (148;149), następnie także jako reakcje typu *multiplex*, równocześnie wykrywające mutację S i Z (150). We wspomnianych

pracach zastosowano sondy hybrydizacyjne i genotypowanie oparte na analizie krzywych topnienia. W reakcji biorą udział dwa specyficzne względem sekwencji oligonukleotydy, jeden odgrywa rolę kotwicy - *anchor* (czasami także spełnia funkcję startera), drugi stanowi typową sondę dyskryminującą (w zależności od protokołu specyficzną względem allele prawidłowego lub zmutowanego). Jeden z oligonukleotydów wyznakowany jest barwnikiem fluorescencyjnym spełniającym rolę donora, natomiast drugi ma przyłączony akceptor. Zjawisko bezpromienistego przeniesienia energii fluorescencji (FRET – *fluorescence resonance energy transfer*) następuje tylko w sytuacji przyłączenia się obu oligonukleotydów do nici DNA. Detekcji podlega fluorescencja akceptora, na który energia przenoszona jest z wzbudzonego donora tylko w przypadku bezpośredniej bliskości obu barwników. Wyniki genotypowania odczytywane są po zakończeniu amplifikacji podczas analizy krzywych topnienia. Reakcję przeprowadzano we wspomnianych prac w szklanych kapilarach w termocyklerze LightCycler (Roche Diagnostic).

W porównaniu do technik opierających się na analizie krzywych topnienia prezentowana metoda wydaje się być bardziej wiarygodna w przypadku występowania innej mutacji w bezpośrednim sąsiedztwie analizowanego miejsca. W tej sytuacji nietypowa temperatura topnienia obserwowana w trakcie analizy krzywych topnienia może być nie do odróżnienia od stwierdzanej w przypadku występowania analizowanej mutacji. W reakcji *5'-nuclease assay* biorą udział 2. sondy: jedna specyficzna względem allele prawidłowego, druga – zmutowanego; tak więc występowanie w pobliżu dodatkowych mutacji w równym stopniu wpływa na proces hybrydizacji oligonukleotydów. Ze względu na wysoce polimorficzny charakter genu AAT w tym wypadku wydaje się to szczególnie istotne.

Niniejsza praca jest jedną z pierwszych dotyczącą zastosowania *5'-nuclease assay* i podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych w diagnostyce niedoborów AAT. Wcześniej Behrens *et al.* (151) opisali zastosowanie metody *TaqMan* m.in. w detekcji niedoborów AAT, lecz posługiwali się gotowymi, komercyjnymi zestawami i nie podali sekwencji sond.

W porównaniu do wszystkich wcześniej prezentowanych przykładów zastosowania *real-time* PCR w detekcji deficytów AAT, opracowana metoda została przetestowana na znacznie większej populacji. Podobnie jak w większości ww. prac (148;150), jako metodę referencyjną wybrano RFLP, zamiast sekwencjonowania. W

momencie jej opracowywania na rynku nie były dostępne enzymy restrykcyjne, mogące zostać zastosowane w genotypowaniu mutacji S lub Z. Stosunkowo powszechnie stosowaną techniką była analiza miejsc restrykcyjnych z użyciem starterów mutagennych (152-155). Obecnie dostępne restryktazy mogące zostać bezpośrednio użyte w diagnostyce tych alleli, opracowano również ich zastosowanie w reakcja typu *multiplex* (156). Niemniej, ponieważ RFLP wymaga dalszej obróbki postamplifikacyjnej, utrudnia to jego zastosowanie w diagnostyce dużych grup populacyjnych. Metoda ta została przez nas użyta jako test referencyjny w przypadku walidacji *real-time* PCR. Zgodność pomiędzy tymi technikami genotypowania wystąpiła w 100%. Dodatkowo wykonano zewnętrzną walidację międzylaboratoryjną wyników w oparciu o próbki kontrolne. Przetestowanie opracowanej metody genotypowania na dużej grupie populacyjnej, wraz z walidacją wewnętrzną i zewnętrzną, umożliwiło włączenie jej do panelu badań diagnostycznych stosowanych w praktyce klinicznej.

Przebadano także 50 osób z objawami płucnymi i obniżonym stężeniem AAT (w tym dwie rodziny), znajdując w tej grupie 4 homozygoty Z i 7 heterozygoty MZ, oraz potwierdzając korelację rodzinną. Metoda ta okazała się również skuteczna przy użyciu DNA izolowanego z homogenizatów świeżo mrożonych wycinków z raka jelita grubego (około 100 próbek).

Wśród przypadków o obniżonym stężeniu AAT w surowicy i nieobecności któregoś z dwóch najczęstszych alleli niedoborowych (PI*S i PI*Z), potwierdzano uzyskane wyniki genotypowania oraz poszukiwano rzadszych mutacji. W tym celu wykonano fenotypowanie białka techniką ogniskowania izoelektrycznego w żelach poliakrylamidowych w wąskim gradiencie pH. Stosując tą metodę potwierdzono nieobecność alleli niedoborowych PI*S i PI*Z, a także, na podstawie zgodności obrazu prążków z wzorem dla wariantu M wykluczono występowanie innych, rzadszych mutacji. Niemniej, ograniczeniem tego drugiego wniosku w przypadku diagnostyki fenotypowej był brak dostępu do surowic wzorcowych dla innych alleli.

W pracy zastosowano metodę *5'-nuclease assay* i stosunkowo najprostsze sondy molekularne, czyli podwójnie znakowane oligonukleotydy specyficzne względem sekwencji. Jest to wybór pomiędzy bardziej zaawansowanymi, ale i znacznie kosztownymi sondami stosowanymi w jakościowym *real-time* PCR, a ceną badania i jego dostępnością. Niniejszy protokół diagnostyczny może zostać przeprowadzony w

każdym termocyklerze z modulem optycznym. Bardziej złożone sondy typu „*molecular beacons*” zostały zaproponowane w diagnostyce innych, rzadszych alleli AAT (157).

Ograniczeniem tej metody, podobnie jak większości technik genotypowania, jest niewykrywanie innych, rzadszych alleli. Technika ta pozwala potwierdzić lub wykluczyć występowanie mutacji S lub Z, nie można natomiast na jej podstawie wnioskować o innych, spośród kilkudziesięciu mogących pojawić się mutacji. Dlatego też wyniki genotypowania poprawnie powinny być przedstawione następująco: S, Z lub „nie-S i nie-Z”. Należy przyznać wyższość fenotypowaniu AAT, uznawanemu za „złoty standard” diagnostyki niedoborów, przede wszystkim ze względu na możliwość wykrywania większości wariantów AAT. Technika ta jest niestety kosztowna, czasochłonna i wymagająca dużego doświadczenia w interpretacji wyników, a przez to ograniczona do wysoce specjalistycznych laboratoriów referencyjnych. Należy mieć jednak na uwadze, że allele S i Z odpowiadają za ponad 95 – 97% wszystkich przypadków niedoborów AAT. Proces diagnostyki klinicznej powinien rozpoczynać się od oznaczenia stężenia białka w surowicy, metody stosunkowo taniej i łatwej oraz powszechnie dostępnej. Pewien wyjątek stanowią tu dzieci z objawami wątrobowymi, u których część autorów zaleca rozpoczęcie diagnostyki od fenotypowania lub genotypowania (158-160). Ponieważ jednak AAT jest białkiem ostrej fazy i jej stężenie może 3 – 4 krotnie wzrastać w czasie reakcji zapalnych lub urazów, ogranicza to skuteczność diagnostyczną tego testu, zwłaszcza w wykrywaniu niedoborów częściowych. Kolejnym krokiem powinno być zatem genotypowanie niedoborów pod kątem występowania najczęstszych mutacji, natomiast w przypadku nie stwierdzenia obecności allele PI*S lub PI*Z, a przy występowaniu objawów klinicznych, lub obniżonego stężenia AAT, należy rozważyć rozszerzenie diagnostyki o genotypowanie w kierunku innych, rzadszych alleli niedoborowych lub fenotypowanie białka.

5.3. Częstości alleli niedoborowych PI*S i PI*Z

W niniejszej pracy, opierając się na wynikach genotypowania losowej, reprezentatywnej próby populacyjnej, oszacowano występowanie dwóch najczęstszych alleli niedoborowych AAT, tj. PI*S i PI*Z. Wstępnie oszacowano te wartości w specjalnie w tym celu zebranej losowej próbie populacyjnej mieszkańców

miasta Krakowa. Następnie, wykorzystując opracowane metody diagnostyczne, poddano genotypowaniu także 309 próbek DNA pochodzących z wcześniej zebranej losowej próby mieszkańców Kazimierza, jednej z dzielnic Krakowa. Ponieważ nie stwierdzono znamiennych różnic w częstościach genotypów pomiędzy obiema kohortami postanowiono je połączyć celem zwiększenia dokładności oszacowania. Łącznie zatem diagnostyce genetycznej poddano 859 osób, losowo wybranych spośród mieszkańców Krakowa i wyniki dla tej grupy wykorzystano następnie celem oszacowania liczebności genotypów w Krakowie i Polsce. Obliczona częstość allele S wynosi 1,75% (95% CI: 1,18 – 2,48), natomiast Z – 1,05% (95% CI: 0,62 – 1,65). Analizowana populacja pozostaje w równowadze Hardy’ego – Weinberga.

Jak wspomniano, wiarygodność oszacowania częstości w populacji ogólnej wzrasta przy zastosowaniu losowej, reprezentatywnej próby populacyjnej. Istotna jest także zastosowana metoda diagnostyczna. Ze względu na niską częstość występowania homozygot Z, oszacowanie allele PI^*Z opiera się na podstawie analizy heterozygot MZ. Pomiar stężenia białka w surowicy, będący metodą mało skuteczną w wykrywaniu niedoborów częściowych, jest zatem bezużyteczny w tego typu analizach. Elektroforeza białka w żelach skrobiowych, obecnie niestosowana, sprawiała trudności w wykrywaniu wariantu PI^*Z ze względu na niewielkie ilości białka w surowicy. Detekcja homozygot Z była możliwa – brak prążków, niemniej w przypadku heterozygot MZ następowała znaczna nadrozpoznawalność fenotypu PI^*MM . W przypadku wprowadzonego następnie ogniskowania izoelektrycznego, wpływ na wyniki może mieć przechowywanie próbki, a także częste jej rozmrażanie, prowadzące do istotnego zaburzenia obrazu prążków (np. fałszywy obraz FM w przypadku homozygot M). Także schorzenia wątroby mogą wpływać na zafałszowanie diagnostyki metoda IEF – fałszywy obraz SZ u homozygot Z. Dlatego też, w badaniach populacyjnych metody genotypowania wydają się być najbardziej wiarygodne (38).

Jest to pierwsze w naszym kraju opracowanie wykorzystujące w tym celu metody genotypowania, a także pierwsze opierająca się na analizie reprezentatywnej próby populacyjnej. Jednakże problem częstości niedoborów w Polsce był analizowany na przestrzeni ostatnich 30 lat wielokrotnie.

Pierwszym i dotyczącym największej liczby osób oszacowaniem częstości wariantów niedoborowych jest badanie przeprowadzone przez Barbarę Opolską.

Obejmowało ono 3650 osób pochodzących z terenu Polski południowej zgłaszających się do zakładu Medycyny Sadowej w Krakowie w sprawach o dochodzenie spornego ojcostwa (161). Badanie przeprowadzono metodą elektroforezy na żelach skrobiowych. Natomiast Kowalska *et al.* (162;163) przeprowadzili badanie częstości fenotypów AAT wśród niespokrewnionych mieszkańców Poznania (n = 450) i zdrowych dawców krwi (n = 181) techniką ogniskowania izoelektrycznego białka surowicy w żelach agarozowych. W 1995 roku została opublikowana kolejna praca Kowalskiej *et al.* (164) dotycząca określenia częstości wśród 741 noworodków pochodzących z Bydgoszczy, Warszawy, Poznania, Piły i Ciechanowa. Materiał w tym przypadku stanowiła surowica otrzymana z krwi pępowinowej. Walter *et al.* (165) z kolei przeprowadzili badanie wśród 195 mieszkańców Ostrowa Wielkopolskiego. Wyniki poszczególnych badań zebrano w tabeli poniżej.

Tabela 21.
Wyniki prac badawczych oceniających częstości wariantów niedoborowych AAT w polskiej populacji.

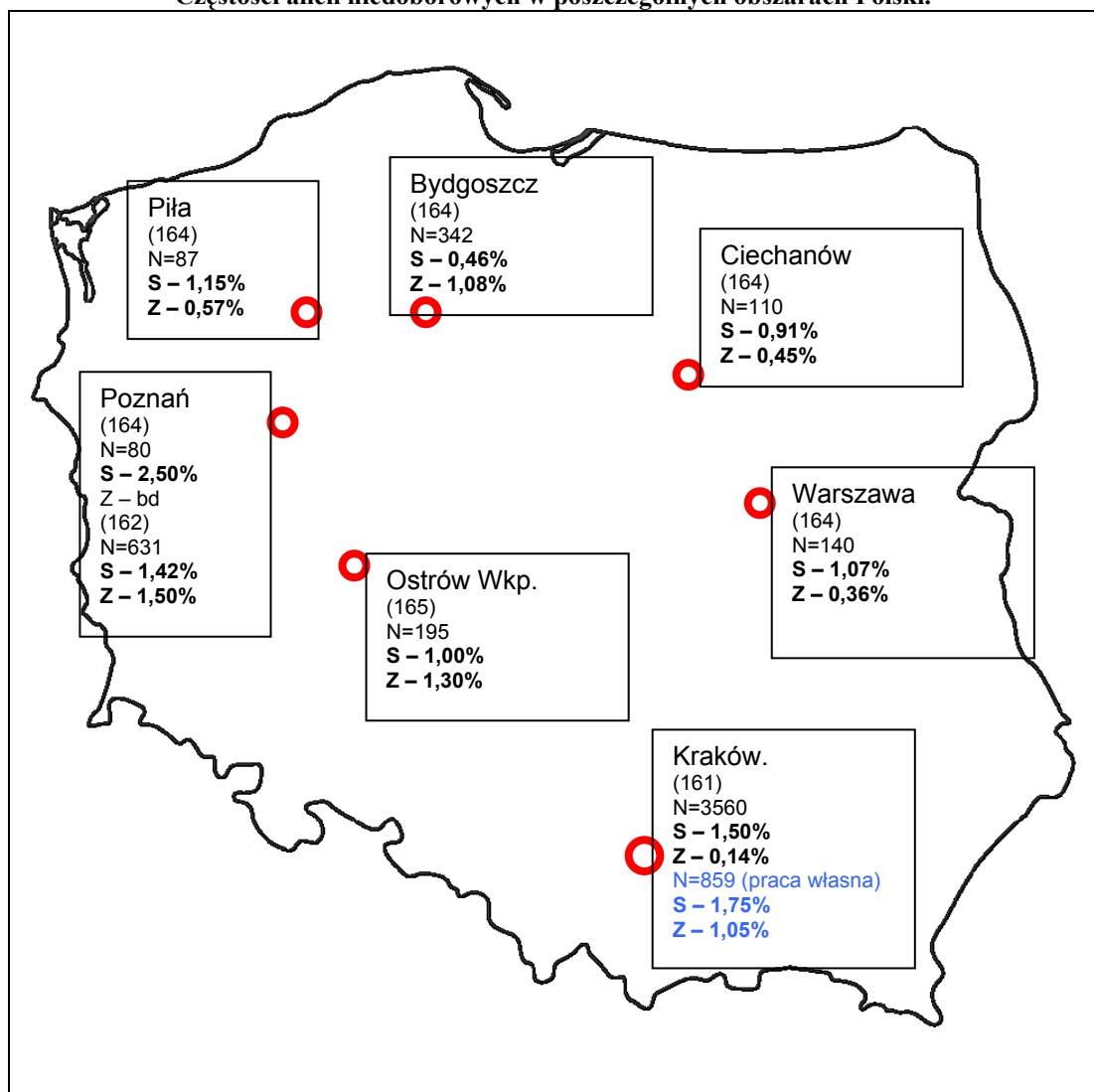
Badanie	N	Metoda	S (%) [CI 95%]	Z (%) [CI 95%]	MS (n)	MZ (n)	SZ (n)	SS (n)	ZZ (n)
Praca własna	859	Genotypowanie	1,75 [1,11-2,44]	1,05 [0,58-1,57]	28	18	0	1	0
Opolska (161)	3560	Elektroforeza na żelach skrobiowych	1,56	0,14	107	10	0	2	0
Kowalska (162)	631	Ogniskowanie izoelektryczne na żelach agarozowych	1,42	1,50	18	18	0	0	0
Walter (165)	195	Ogniskowanie izoelektryczne na żelach agarozowych	1,0	1,3	-	-	-	-	-
Kowalska (164)	741	Ogniskowanie izoelektryczne na żelach agarozowych	0,94	0,67	12	10	0	1	0

Otrzymane w niniejszej pracy częstości alleliczne nie różnią się znacząco w porównaniu do wyników wcześniejszych prac badawczych. Jedynie w pracy Opolskiej stwierdzono 7-krotnie niższą częstość wariantu Pi*Z, co można tłumaczyć wspomnianą, niedostateczną czułością oceny fenotypów podczas elektroforezy w

żelach skrobiowych. W przypadku częstości allele PI*S własne wyniki należą do najwyższych z dotychczas publikowanych, natomiast w odniesieniu do allele PI*Z stwierdzone przez nas częstości są zbliżone do średniej z wcześniejszych opracowań.

Obserwowane różnice pomiędzy poszczególnymi obszarami kraju, wyszczególnione na rycinie poniżej, najprawdopodobniej nie wynikają z różnic populacyjnych, a raczej są spowodowane nielosowym doбором próby do badań oraz w części, zbyt niskimi liczebnościami.

Rycina 33.
Częstości allele niedoborowych w poszczególnych obszarach Polski.



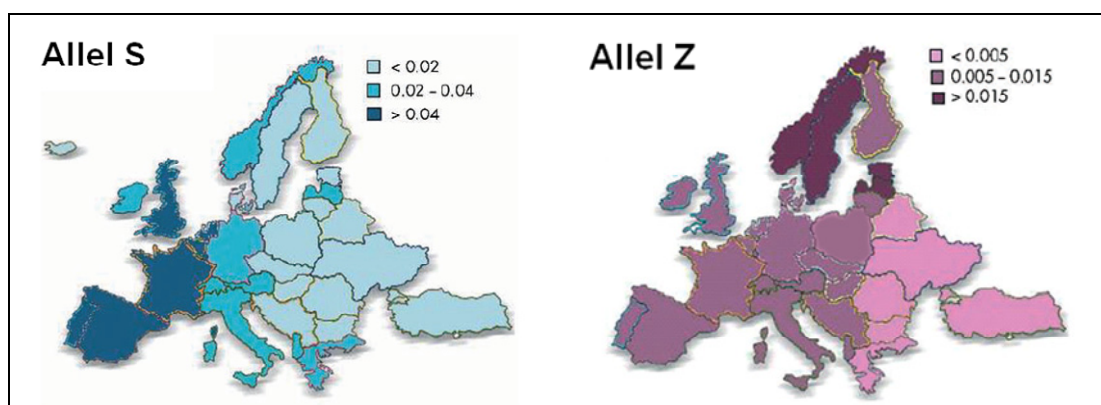
Blanko *et al.* (44) w opublikowanej w bieżącym roku metaanalizie częstości allele niedoborowych w Europie, podali następujące wartości dla Polski: Z – 0,4% (95% CI: 0,3 – 0,5) oraz S – 1,5% (95% CI: 1,3 – 1,7). Wyniki te zostały obliczone na podstawie analizy łącznej kohorty 9 539 osób, odwołującej się do sześciu następujących publikacji: (14;162-166). Przedstawiony wynik jest obciążony błędem

wynikającym nie tylko z włączenia do analizy badań nie opierających się na losowej, reprezentatywnej, próbie populacyjnej; ale także, najprawdopodobniej brakiem dostępu do wszystkich tekstów w języku angielskim. Cztery z powyższych prac zostały opisane powyżej (162-165), przy czym publikacje (162;163) dotyczą tej samej populacji. Z kolei prace (14;166) określały fenotyp AAT wśród pacjentów z astmą lub ze schorzeniami wątroby, natomiast znalazło się w nich odniesienie do pracy Opolskiej (161), jako grupy kontrolnej. Przypuszczalnie, autorzy metaanalizy, nie mając dostępu do wszystkich tekstów w języku angielskim i opierając się jedynie na analizie abstraktów lub danych liczbowych w tabelach, zdublowali część ocenianych populacji i pochodzących z nich wyników, a także nieświadomie włączyli dane nt. częstości allele PI*Z płynące z diagnostyki za pomocą elektroforezy w żelach skrobiowych (która, zaniżając znacznie częstość tego wariantu znajdowała się w kryteriach wykluczenia z prezentowanej metaanalizy). Zaowocowało to znacznie zawyżoną liczebnością analizowanej kohorty i wynikami obciążanymi dużym błędem, zwłaszcza w przypadku allele Z.

Spośród innych wariantów niedoborowych AAT w polskiej populacji technikami fenotypowania Opolska (161) stwierdziła: Pi*F – o częstości 0,07%; Pi*V – 0,04% oraz Pi*J – 0,01%. Natomiast Kowalska *et al.* (162) w populacji Poznania zdiagnozowali: Pi*I – 0,08% i Pi*R – 0,08%, a w grupie noworodków (164) podają łącznie częstość wariantów Pi*F, I i L wynoszącą 0,6%. Ponadto Kowalska w swojej pierwszej pracy ustaliła częstości poszczególnych podtypów wariantu prawidłowego Pi*M: M1 – 74,64%; M2 – 16,65% i M3 – 5,70%; co zostało potwierdzone także w drugiej publikacji tej autorki: M1 – 71,99%; M2 – 16,13% i M3 – 9,65%.

Na podstawie oszacowanych w niniejszej pracy częstości allelicznych, Polska z PI*S – 1,75% i PI*Z – 1,05% należy do krajów Europy o umiarkowanych częstościach alleli deficytowych w Europie. Wpisuje się także w transeuropejskie gradienty częstości allele S i Z obserwowane na naszym kontynencie, które omówiono we wstępie pracy. W porównaniu do naszych wschodnich i zachodnich sąsiadów stwierdzone wyniki nie różnią się znacząco. W Rosji częstości te oszacowano na: PI*S – 1,0% (95% CI: 0,7 – 1,3); PI*Z – 0,3% (95% CI: 0,2- 0,5); na Litwie: PI*S – 1,7% (95% CI: 1,3 – 2,1); PI*Z – 1,5% (95% CI: 1,2- 1,9) natomiast w Niemczech: PI*S – 2,1% (95% CI: 1,8 – 2,3); PI*Z – 0,98% (95% CI: 0,8- 1,18) (38;42;44;47;167).

Rycina 34.
Częstości alleliczne PI*S i PI*Z w Europie [Za: (167); zmieniono].



5.4. Stężenie AAT w surowicy

Stężenie AAT w surowicy jest znacząco wyższe u osób palących tytoń, oraz u kobiet. Zależy także od ilości wypalanych dziennie papierosów, indeksu masy ciała, liczby leukocytów i płytek krwi. Palenie tytoniu powoduje oksydację metioniny 358, krytycznej do działania tej serpiny, dodatni związek palenia ze stężeniem AAT wykazano także w innych pracach (122;168;169). Zależność od liczby leukocytów i płytek krwi można wytłumaczyć wzrostem tych parametrów w czasie stanów zapalnych i urazów. Odnośnie wpływu płci to wykazano, że stężenie AAT zwiększa się w czasie ciąży (170;171) oraz przy podawaniu estrogenów (172), niemniej inne badania nie stwierdziły różnic pomiędzy kobietami a mężczyznami analizując ten parametr (168;173). Natomiast ujemna zależność od BMI najprawdopodobniej można tłumaczyć stwierdzonymi istotnymi różnicami pomiędzy płciami odnośnie tej cechy ($p < 0,0001$). Wśród mężczyzn BMI wyniosło bowiem 26,4 (95% CI: 25,8 – 26,9) natomiast u kobiet 24,7 (95% CI: 24,2 – 25,2).

Stężenie AAT różniło się istotnie pomiędzy poszczególnymi genotypami, w przypadku heterozygot MZ i homozygot S było obniżone w stosunku do genotypu prawidłowego (nie-S, nie-Z) o 40%, u heterozygot MS o 14%. Podobną zależność od genotypu stwierdzono także w poprzednich opracowaniach (71;174).

Pomiar stężenia AAT w surowicy jest pierwszym etapem w diagnostyce niedoborów. Przy zakresie wartości prawidłowych 0,9 – 2,0 g/l, które zostały ustalone dla wykrywania ciężkich deficytów, ma on jednak ograniczoną skuteczność w rozpoznawaniu heterozygotyczności. Czułość takiego pomiaru w wykrywaniu niedoborów częściowych wynosi 47%, natomiast swoistość 99%. Celem poprawy

tych parametrów należałoby podnieść dolną wartość zakresu do 1,02 g/l, wtedy czułość wyniosłaby 94%, a swoistość 67% (pole pod krzywą ROC = 0,86). Słuszniejsze wydaje się jednak wdrożenie diagnostyki molekularnej do powszechnej praktyki klinicznej, skuteczniej wykrywającej niedobory częściowe.

5.5. Wytyczne diagnostyki genetycznej niedoborów AAT

Opublikowane niedawno wspólne wytyczne *American Thoracic Society i European Respiratory Society* (71) zwracają uwagę na fakt, że niedobory AAT często pozostają nie zdiagnozowane lub nieprawidłowo rozpoznane. Do stanów klinicznych mogących budzić podejrzenie występowania deficytu należą:

- Rozedma o wczesnym początku (w wieku 45 lat lub poniżej);
- Rozedma przy nieobecności zidentyfikowanych czynników ryzyka (palenie papierosów, zawodowe narażenie na pyły, itd.);
- Rozedma z dotycząca podstawy płuc;
- Niewyjaśniona choroba wątroby;
- Martwicze zapalenie tkanki podskórnej (*panniculitis*);
- Zapalenie naczyń z przeciwciałami przeciwko proteinazie-3 (zapalenie naczyń c-ANCA dodatnie [przeciwciała przeciwko cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych]);
- Wywiad rodzinny obejmujący: rozedmę, rozstrzenia oskrzeli, choroby wątroby, lub zapalenie tkanki podskórnej;
- Rozstrzenia oskrzeli bez wyraźnej etiologii.

Po rozważeniu aspektów klinicznych, ekonomicznych, epidemiologicznych i etycznych, międzynarodowe towarzystwa zalecają stosowanie testów genetycznych w diagnostyce niedoborów AAT w następujących sytuacjach:

- Dorośli objawowi z rozedmą, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) lub astmą oskrzelową z ograniczeniem przepływu powietrza niecałkowicie odwracalnym po agresywnym leczeniu lekami rozszerzającymi oskrzela;

- Osoby z niewyjaśnioną chorobą wątroby, obejmując noworodki, dzieci i dorosłych, zwłaszcza starszych;
- Bezobjawowe osoby z utrwaloną obstrukcją w badaniach płuc, bez możliwych do stwierdzenia czynników ryzyka (np. palenie papierosów, narażenie zawodowe);
- Dorośli z martwiczym zapaleniem tkanki podskórnej (*panniculitis*);
- Rodzeństwo osób z niedoborem AAT.

Na podstawie tych samych wytycznych testy genetyczne należy rozważyć (tzn. badanie genetyczne powinno być przedyskutowane i może być racjonalnie przyjęte lub zaniechane) w przypadkach:

- Dorośli z rozstrzeniami oskrzeli bez widocznej etiologii;
- Młodzi dorośli z utrwalonym ograniczeniem przepływu powietrza w drogach oddechowych;
- Bezobjawowe osoby z utrwalonym ograniczeniem przepływu powietrza i bez czynników ryzyka;
- Dorośli z zapaleniem naczyń c-ANCA dodatnim (z przeciwciałami przeciwko proteinazie-3);
- Osoby z POChP lub chorobą wątroby w wywiadzie rodzinnym nie przypisywaną do niedoboru AAT;
- Dalecy krewni osób z homozygotycznym niedoborem AAT;
- Potomstwo i rodzice osób z homozygotycznym niedoborem AAT;
- Rodzeństwo, potomstwo i rodzice lub odlegli krewni osób z heterozygotycznym niedoborem AAT;
- Osoby z wysokim ryzykiem obecności schorzeń związanych z niedoborem AAT (w przypadku oceny stanu nosicielstwa w odniesieniu do planowania potomstwa);
- Osoby, które same nie wykazują ryzyka niedoboru AAT, ale będące rodzicami osób z homo- lub heterozygotycznym niedoborem AAT (w

przypadku oceny stanu nosicielstwa w odniesieniu do planowania potomstwa).

Nie zaleca natomiast się genetycznych badań przesiewowych u noworodków, młodzieży, jak i dorosłych. Wyjątki mogą mieć miejsce w krajach spełniających trzy warunki: (i) rozpowszechnienie niedoborów AAT jest wysokie (około 1/1 500 lub więcej); (ii) palenie jest rozpowszechnione; i (iii) dostępne jest odpowiednie poradnictwo. Biorąc pod uwagę oszacowane w niniejszej, jak i poprzednich pracach, umiarkowane częstości alleli niedoborowych, Polska nie znajduje się w grupie krajów, gdzie wymagane byłoby badania przesiewowe populacji ogólnej.

Niemniej, powszechnie niedobory AAT są rzadko prawidłowo diagnozowane (175). Co więcej średni wiek rozpoznania wynosi 45,5 lat (SD 9,5), a od pierwszych objawów do diagnozy upływa około 8,3 roku (SD 6,9). Najbardziej niepokojące jest jednak, że nie stwierdzono znaczącego postępu we wcześniejszej diagnostyce pomiędzy latami 1968 a 2003 (176). Ze względu na ograniczoną wartość pomiaru stężenia AAT w surowicy oraz małą dostępność technik fenotypowania, w kontekście przedstawionych zaleceń należy rozważyć w naszym kraju wprowadzenie metod genotypowania niedoborów do powszechnej, ogólnodostępnej praktyki klinicznej. Konieczność ta poparta jest faktem, że wczesne wykrycie predyspozycji genetycznej, w połączeniu z prawidłową opieką lekarską i zmianą trybu życia, prowadzić może do uniknięcia lub opóźnienia rozwoju choroby, co jest szczególnie ważne przy braku skutecznego i powszechnie dostępnego leczenia przyczynowego. Diagnostyka taka mogłaby odbywać się w naszym kraju nawet w oparciu o jedno, centralne laboratorium. Polska należy co prawda do grupy krajów o umiarkowanej częstości alleli niedoborowych, ale i tak należy oczekiwać około 4 189 (95% CI: 1 284 – 9 406) pacjentów z ciężkim wrodzonym niedoborem AAT i 25 600 (95% CI: 12 616 – 51 958) nosicieli, z ryzykiem rozwoju powikłań w przypadku np. nałogowego palenia papierosów lub narażenia zawodowego. Bez opracowania i wdrożenia narodowego programu wykrywania AAT osoby te mają obecnie małą szansę na prawidłową diagnostykę i leczenie.

Rozwój diagnostyki molekularnej niedoborów AAT w Polsce powinien wiązać się z utworzeniem odpowiedniej sieci ośrodków zajmujących się rozpoznawaniem klinicznym i leczeniem tych pacjentów, oraz Narodowego Rejestru Chorych, na wzór istniejących w innych krajach europejskich i Ameryki Północnej. Najstarszym

jest narodowy rejestr w Szwecji obejmujący ponad 900 przypadków, do największych należy natomiast *National Registry of Patients with Severe Deficiency of Alpha₁-Antitrypsin* (177), utworzony w 1988 przez *National Heart, Lung and Blood Institute* i obejmujący 37 ośrodków w USA i Kanadzie (w rejestrze łącznie ponad 1300 pacjentów z ciężkim niedoborem). Rejestry takie i narodowe programy diagnostyki następnie powstały także w Danii, Niemczech, Belgii, Hiszpanii, Włoszech i Wielkiej Brytanii (178). Ponad 8 lat temu ośrodki te połączyły się w jedną sieć i międzynarodowy rejestr *Alpha One International Registry*, obejmujący obecnie 20 krajów⁹. Ważną rolę odgrywają także stowarzyszenia i fundacje, np.: *AlphaNet*, *Alpha One Foundation* (179). Odnosnie narodowych programów diagnostyki, wdrożenie takiego systemu oraz utworzenie rejestru chorych we Włoszech, kraju o nieznacznie wyższych częstościach występowania alleli niedoborowych w porównaniu do Polski, zaowocowało wykryciem w ciągu 5 lat, przy celowanym skriningu, który objął 1841 osób podejrzanych o niedobór, 151 nowych przypadków ciężkiego niedoboru (180).

Opracowana w ramach niniejszej pracy metoda genotypowania dwóch najczęstszych alleli niedoborowych PI*S i PI*Z poddana została walidacji wewnętrznej i zewnętrznej, a także przetestowana została na dużej grupie populacyjnej. Charakteryzuje się także stosunkowo niskimi kosztami jednostkowymi oraz szybkością otrzymywania wyników i niską pracochłonnością, przez co nadaje się do diagnostyki nawet dużych grup populacyjnych. Mogłaby zatem zostać wykorzystana w ogólnopolskiej diagnostyce molekularnej niedoborów AAT, zgodnie z przedstawionymi zaleceniami ATS/ERS. Pełne dopracowanie prezentowanej metody wymagałoby w takiej sytuacji dodatkowej walidacji także na analizę DNA izolowanego nie tylko z pełnej krwi, ale także np. z pasków bibuły (181), co znacznie ułatwiłoby przesyłanie materiału do badania.

⁹ <http://www.aatregistry.org/>

6. WNIOSKI

1. Spośród 1500 losowo wybranych mieszkańców miasta Krakowa, do uczestnictwa w badaniu zgłosiło się 550 osób, zatem współczynnik odpowiedzi wyniósł 36,7%. Pomimo ograniczeń związanych ze stosunkowo niskim odsetkiem odpowiedzi, analizowaną próbę populacyjną można uznać za reprezentatywną.
2. Opracowana szybka metoda genotypowania dwóch alleli niedoborowych PI*S i PI*Z AAT za pomocą amplifikacji DNA z użyciem pary podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych i detekcją produktu w czasie reakcji (*real-time* PCR) okazała się wydajna i atrakcyjna ekonomicznie. Ponadto pomyślnie przeszła proces walidacji za pomocą genotypowania analizą miejsc restrykcyjnych (RFLP) oraz zewnętrznej kontroli międzylaboratoryjnej. Zgodność genotypów wystąpiła niezależnie od stosowanej metody.
3. Obliczona w łącznej kohorcie mieszkańców Krakowa ($n = 859$) częstość allele S wynosi 1,75% (95% CI: 1,18 – 2,48) natomiast Z – 1,05% (95% CI: 0,62 – 1,65). Analizowana populacja pozostaje w równowadze Hardy’ego-Weinberga.
4. W grupie osób z prawidłowym genotypem (nie-S, nie-Z) wartość średniego stężenia AAT w surowicy oznaczana metodą nefelometryczną jest istotnie wyższa od heterozygot MS (o 14%) oraz MZ (o 40%); różnice pomiędzy MS a MZ także są znamienne statystycznie. Czulość pomiaru stężenia AAT w diagnostyce niedoborów częściowych wynosi 46,7% (95% CI: 28,3 – 65,7), natomiast swoistość 99,0% (97,8 – 99,7).
5. Na podstawie przeprowadzonej analizy w skali całego kraju można oczekiwać 4 189 (95% CI: 1 284 – 9 406) pacjentów z ciężkim wrodzonym niedoborem AAT (homozygoty Z) oraz 2 098 435 (95% CI: 1 255 905 – 3 050 061) osób z deficytami częściowymi (MS, MZ, SS, SZ).

7. STRESZCZENIE

Wstęp. Ciężki niedobór alfa₁-antytrypsyny (AAT) jest jedną z najczęstszych chorób genetycznych wśród rasy białej. Zachwianie równowagi proteazy-antyproteazy w tkance płucnej prowadzi do rozwoju rozedmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) o wczesnym początku (poniżej 45 roku życia), a polimeryzujące w hepatocytach nieprawidłowe białko powoduje schorzenia wątroby (przedłużona żółtaczka noworodków, marskość, rak). Brak jest wiarygodnych oszacowań częstości najpowszechniejszych alleli niedoborowych PI*Z i PI*S w polskiej populacji. Celem niniejszej pracy była ocena ich rzeczywistej częstości na podstawie analizy reprezentatywnej próby populacyjnej metodami genetycznymi wraz z opracowaniem metodyki nadającej się do badań przesiewowych i jej odniesienie do wartości diagnostycznej powszechnie stosowanego pomiaru stężenia AAT.

Materiał i metody. Do 1500 losowo wybranych mieszkańców Krakowa wysłano zaproszenie do uczestnictwa w badaniu, po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej. Od ochotników pobierano próbki krwi, z której izolowano DNA, natomiast w surowicy wykonano pomiar stężenia AAT metodą nefelometryczną. By zwiększyć dokładność oszacowania, dodatkowo wykonano badanie 309 próbek DNA zebranych wcześniej od losowo dobranych mieszkańców Kazimierza, jednej z dzielnic Krakowa. Celem genotypowania dwóch alleli niedoborowych PI*S i PI*Z, wykorzystano szybką i stosunkowo taną technikę jakościowego *real-time* PCR, czyli amplifikacji DNA z użyciem pary podwójnie znakowanych sond oligonukleotydowych i detekcją produktu w czasie reakcji. Referencyjnym testem genotypowania była metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). W przypadku osób u których nie stwierdzono obecności allela niedoborowego PI*S lub PI*Z, natomiast stężenie AAT było poniżej wartości prawidłowych, potwierdzono otrzymane wyniki fenotypowaniem metodą ogniskowania izoelektrycznego na żelach poliakrylamidowym w wąskim gradiencie pH.

Wyniki. Do uczestnictwa w badaniu zgłosiło się 550 osób (248 mężczyzn i 302 kobiet). Współczynnik odpowiedzi wyniósł zatem 36,7%. Wyższą odpowiedź zanotowano w starszych grupach wiekowych.

Walidacji metody dokonano potwierdzając wyniki za pomocą genotypowania analizą miejsc restrykcyjnych (RFLP) oraz zewnętrzną kontrolą międzylaboratoryjną. W każdym przypadku wystąpiła zgodność otrzymanych rezultatów pomiędzy stosowanymi metodami.

W losowej, reprezentatywnej próbie populacji Krakowa ($n = 550$) zdiagnozowano 17 heterozygot MS, 12 – MZ i jedną homozygotę S. Częstości alleli niedoborowych wynosiły zatem: S – 1,73% (95% CI: 1,09 – 2,55); Z – 1,09% (95% CI: 0,45 – 1,82). Nie stwierdzono znamiennych różnic w częstościach genotypów z zebraną wcześniej próbą populacyjną, zatem połączono obie populacje ponownie dokonując oszacowania częstości alleli niedoborowych. Obliczona w łącznej kohorcie ($n = 859$) częstość allele S wynosi 1,75% (95% CI: 1,18 – 2,48) natomiast Z – 1,05% (95% CI: 0,62 – 1,65). Analizowana populacja pozostaje w równowadze Hardy’ego-Weinberga.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że ciężkie niedobory AAT w populacji Krakowa występują z częstością 1/9 110 osób (95% CI: 1/4 057 – 1/29 727), natomiast częściorowe: 1/3 279 (95% CI: 1/1 680 – 1/ 8 116).

W grupie osób z prawidłowym genotypem (nie-S, nie-Z) wartość średniego stężenia AAT w surowicy (zakres prawidłowy: 0,9 – 2,0 g/l) wynosi 1,26 g/l (SD 0,21) i jest istotnie wyższa od stężenia w przypadku heterozygot MS – 1,09 g/l (SD 0,14) oraz MZ – 0,76 g/l (SD 0,06); różnice pomiędzy MS a MZ także znamienne statystycznie. Czułość pomiaru stężenia AAT w diagnostyce niedoborów częściowych wynosi 46,7% (95% CI: 28,3 – 65,7), natomiast swoistość 99,0% (95% CI: 97,8 – 99,7).

Wnioski. Pomiar stężenia białka w surowicy ma ograniczoną wartość, szczególnie w diagnostyce niedoborów częściowych. Wczesne wykrycie predyspozycji genetycznej, w połączeniu z prawidłową opieką lekarską i zmianą trybu życia, prowadzić może do uniknięcia lub opóźnienia rozwoju choroby, co jest szczególnie ważne przy braku skutecznego i powszechnie dostępnego leczenia przyczynowego. W polskiej populacji należy oczekiwać 4 189 (95% CI: 1 284 – 9 406) pacjentów z ciężkimi niedoborami (homozygoty Z) oraz 2 098 435 (95% CI: 1 255 905 – 3 050 061) osób z deficytami częściowymi (MS, MZ, SS, SZ). Należy rozważyć wprowadzenie w Polsce diagnostyki genetycznej niedoborów do

powszechnej praktyki klinicznej, zgodnie ze wspólnymi wytycznymi *American Thoracic Society i European Respiratory Society*.

8. SUMMARY

Background. Severe α_1 -antitrypsin (AAT) deficiency is one of the most common generic disorders in Caucasians. The imbalance of protease-antiprotease ratio in the lung tissue leads to the early-onset (below 45 years of age) emphysema and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Abnormal protein can polymerize in hepatocytes causing liver disorders such as prolonged neonatal jaundice, cirrhosis and cancer. Presently, there are not reliable estimates of frequencies for the most common deficiency alleles' in Polish population. The aim of this study was to assess the unbiased frequencies using genetic tests and the representative sample of Polish population. Therefore, we developed methods of genotyping useful for a cross-sectional studies and referenced these methods to commonly applied measurement of AAT level in serum, checking its diagnostic value.

Materials and methods. An invitation letter was send to 1,500 randomly selected residents of Kraków, after approval from the Ethics Committee. From participants blood samples were taken, and DNA isolated. The serum level of AAT was measured using nephelometry. Additionally, to increase the precision of allelic frequency estimation, genotyping of 309 samples of DNA was completed from a randomly selected residents of Kazimierz, one of Kraków's districts, collected in a previous study. The rapid method of genotyping was developed for two AAT deficiency alleles; PI*S and PI*Z, using qualitative real-time PCR and dual-labeled fluorescent oligoprobes. The restriction fragments length polymorphism was a reference method. For genotypes not containing deficiency alleles, if the level of AAT was below the reference limit, the results were confirmed by phenotyping of AAT using isoelectric focusing electrophoresis on polyacrylamide gels in narrow pH gradient.

Results. 550 inhabitants (248 men and 302 women) participated in our study. The response rate was 36,7%. Significantly higher response was noted in the older age groups.

A validation was accomplished by confirmation of genotyping results using reference assay (restriction fragments length polymorphism) and by external

interlaboratory control. In each case there was a perfect match of results between all methods used.

In the random, representative sample of Kraków population ($n = 550$), 17 heterozygotes MS, 12 heterozygotes MZ and 1 homozygote S were diagnosed. Therefore, the frequency of allele PI*S was 1.73% (95% CI: 1.09 – 2.55); and PI*Z – 1.09% (95% CI: 0.45 – 1.82). In the total group of 859 subjects, the frequency of PI*S allele was 1.75% (95% CI: 1.18 – 2.48) and PI*Z – 1.05% (95% CI: 0.62 – 1.65). The populations were in the Hardy-Weinberg equilibrium.

Therefore, the prevalence of severe deficiency is 1/9 110 (95% CI: 1/4 057 – 1/29 727) and of the partial one – 1/3 279 (95% CI: 1/1 680 – 1/ 8 116).

In the group of subjects with wild genotype (non-S and non-Z) the mean level of AAT in serum (normal range: 0.9 – 2.0 g/L) was 1.26 g/L (range: 0.85 – 2.51); in heterozygotes MS – 1.09 g/L (range: 0.84 – 1.33) and in heterozygotes MZ – 0.76 (range: 0.66 – 0.85). The differences of these levels between genotypes were statistically significant. The sensitivity of AAT measurement in partial deficiency detection was 46.7% (95% CI: 28.3 – 65.7) and specificity – 99.0% (95% CI: 97.8 – 99.7).

Conclusions. The measurement of AAT level in serum has a limited value, especially in diagnosis of partial deficiency. Early diagnosis of genetic predisposition, with the appropriate medical care and changing in life style can lead to prevention or delaying of AAT deficiency complications. It is especially important in the case of lack of effective and accessible treatment. In Polish population is expected of about 4 189 (95% CI: 1 284 – 9 406) subjects with severe AAT deficiency (homozygotes Z) and of 2 098 435 (95% CI: 1 255 905 – 3 050 061) with partial deficiencies (MS, MZ, SS, SZ). Introduction of genetic testing of AAT deficiency to common clinical practice, according to guidelines of American Thoracic Society and European Respiratory Society should be considered in Poland.

9. UWAGI

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2005/2006 jako projekt badawczy (nr grantu 2 P05B 128 28).

Autor składa również podziękowania Panu Inż. Andrzejowi Noworycie, Dyrektorowi Okręgu Poczty Polskiej w Krakowie, za przekazanie części znaczków pocztowych celem wysłania zaproszeń do udziału w badaniu,

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. Wzór imiennego listu z zaproszeniem



II KATEDRA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH
COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
Pracownia Biologii Molekularnej
Kierownik Katedry: *Prof. dr hab. med. Andrzej Szczygłelik*
Kierownik Pracowni: *Dr hab. med. Marek Sanak*



LAB/BM/ «Nr scalanego rekordu» /14/06/06

Kraków, dnia r.

Pani «IMIE1» «IMIE2» «NZW1» - «NZW2»

ul. «ULICA» «BUD» / «LOK»

«KOD» «MSC»

Szanowny Panie!

II Katedry Chorób Wewnętrznych rozpoczyna badanie w celu określenia ryzyka wystąpienia częstych chorób wieku dorosłego. W szczególności pragniemy określić częstość występowania niedoborów *alfa-1 antytrypsyny*. Zaburzenie to może powodować choroby wątroby i płuc.

Do udziału w badaniu został Pan wybrany losowo spośród mieszkańców miasta Krakowa. Będzie ono polegało na rozmowie z lekarzem, pomiarze ciśnienia tętniczego i pobraniu niewielkiej ilości krwi. W podziękowaniu bezpłatnie oznaczymy u Pana morfologię krwi i poziomy cholesterolu. Podwyższony cholesterol, któremu można obecnie zapobiegać, jest czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy i wystąpienia zawału serca.

Warunkiem powodzenia naszego badania jest zgłoszenie się wszystkich wylosowanych osób do naszej Kliniki. Tylko dzięki Państwa udziałowi będziemy mogli uzyskać ważne informacje służące poprawie wykrywalności i leczenia chorób.

W przypadku stwierdzenia nieprawidłowego poziomu *alfa-1 antytrypsyny* możemy zaoferować Panu bezpłatną konsultację lekarską w Klinice Uniwersyteckiej.

W razie wątpliwości prosimy o kontakt z Doktorem Marcinem Kaczorem, dostępnym pod numerem telefonu 430 52 66 wew. 321.

Bardzo liczymy na Pańską pozytywną odpowiedź i udział w badaniu!!!

Łącząc wyrazy szacunku,

Prof. dr hab. Andrzej Szczygłelik.

Poniżej przedstawiamy szczegółowe informacje związane z Pańskim udziałem w badaniu:

Prosimy o zgłoszenie się w dniu

, o godzinie

do II Katedry Chorób Wewnętrznych ul. Skawińska 8 (mapka poniżej).

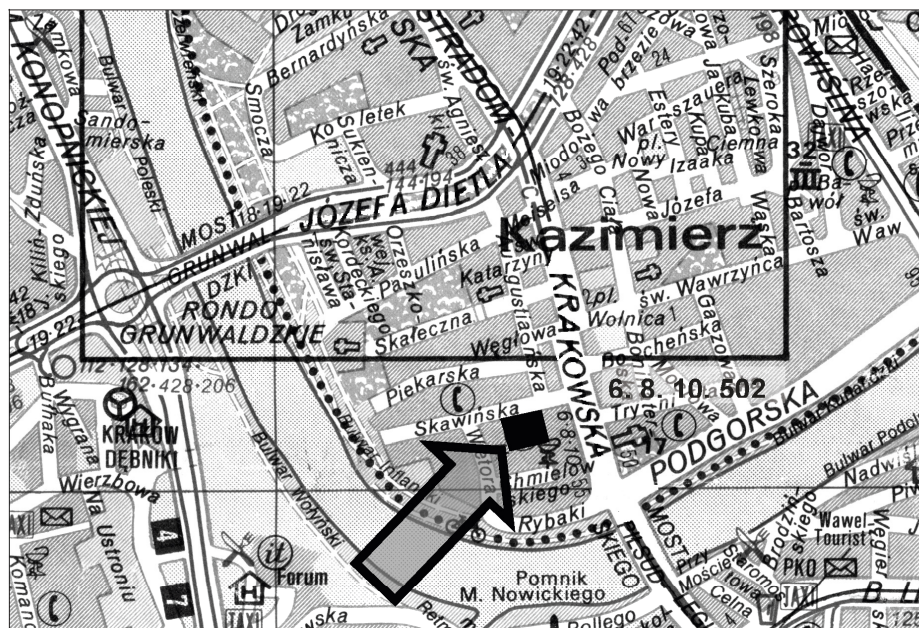
Niniejszy list prosimy pokazać Portierowi, który wskaże Panu drogę do pokoju nr 14 i zawiadomi Doktora Marcina Kaczora o Pańskim przybyciu (wew. 321, lub 303).

Jeżeli powyższy termin Panu nie odpowiada prosimy o zgłoszenie w którymś z podanych terminów, najlepiej po wcześniejszym uzgodnieniu telefonicznym:

Poniedziałek	w godzinach	_____	-	_____
Wtorek	w godzinach	_____	-	_____
Środa	w godzinach	_____	-	_____
Czwartek	w godzinach	_____	-	_____
Piątek	w godzinach	_____	-	_____

Wszelkie szczegółowe informacje zostaną Panu udzielone po zgłoszeniu się do Kliniki. Udział w badaniu jest dobrowolny i wymaga pisemnej zgody.

Ze względu na oznaczanie poziomu cholesterolu prosimy pozostać na czczo przed badaniem.



31-066 Kraków, ul. Skawińska 8 tel. (+ 48 12) 430 52 66 wew. 303, 321

10.2. Informacja dla uczestnika badania



II KATEDRA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH COLLEGIUM MEDICUM UNIwersyteTu JAGIELLOŃSKIEGO

Pracownia Biologii Molekularnej

Kierownik Katedry: *Prof. dr hab. med. Andrzej Szczygielek*

Kierownik Pracowni: *Dr hab. med. Marek Sanak*



„Diagnostyka molekularna zmienności genetycznej *alfa-1* antytrypsyny
i jej wartość kliniczna”

INFORMACJA DLA UCZESTNIKA BADANIA

Proponujemy Pani / Panu uczestnictwo w badaniu naukowym mającym na celu określenie częstości występowania nieprawidłowości genetycznych mogących prowadzić do zaburzeń czynności płuc i wątroby

Po uważnym przeczytaniu poniższych informacji proszę wysłuchać dodatkowych wyjaśnień lekarza, a także wyjaśnić z nim wszelkie nasuwające się pytania i wątpliwości.

Opis badania

Niedobór *alfa-1* antytrypsyny, białka produkowanego przez wątrobę, a odpowiedzialnego za ochronę płuc przed szkodliwymi czynnikami, jest warunkowany genetycznie i prowadzi do zaburzeń czynności wątroby i płuc. Szczególnie jest to nasilone w przypadku osób palących papierosy. Stan ten może pogarszać przebieg przewlekłej obturacyjnej choroby płuc i astmy.

Celem naszego badania jest opracowanie skutecznej metody przesiewowej wykrywającej ten niedobór oraz określenie jak często występuje on w polskiej populacji. Dane epidemiologiczne na temat są skąpe, albo brak ich wcale, opieramy się na informacjach dotyczących społeczeństw Europy Zachodniej i Ameryki Północnej.

Pragniemy również określić w jakim stopniu niedobór tego białka pogarsza przebieg przewlekłej obturacyjnej choroby płuc i astmy.

Po uzyskaniu zgody na udział w badaniu lekarz przeprowadzi z Panią / Panem dokładny wywiad i badanie fizykalne oraz pobrana zostanie krew żylna do badań genetycznych (6 probówek po 4 ml, jedna 9 ml).

Badanie to nie wiąże się z żadnym zagrożeniem dla Pani / Pana zdrowia.

W sytuacji gdy życzy sobie Pani / Pan być poinformowana(y) w przypadku stwierdzenia nieprawidłowych wyników badań genetycznych prosimy o wypełnienie stosownego formularza.

Jednocześnie informujemy, że może Pani / Pan zrezygnować z udziału w badaniu bez podania przyczyny.

Lekarz

Telefon 430 52 66 wew. 321, 303

31-066 Kraków, ul. Skawińska 8 tel. (+ 48 12) 430 52 66 wew. 303, 321

10.3. Pisemna zgoda na udział w badaniu



II KATEDRA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH
COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
Pracownia Biologii Molekularnej
31-066 Kraków, ul. Skawinska 8
tel. (+ 48 12) 430 52 66 wew. 303, 321

Nr badania

--	--	--	--	--

„Diagnostyka molekularna zmienności genetycznej *alfa-1 antytrypsyny*
i jej wartość kliniczna”

FORMULARZ ZGODY NA UDZIAŁ W BADANIU

Ja niżej podpisany(a) _____
(Nazwisko i imię badanego drukowanymi literami)

przeczytałem(am) załączoną informację i omówiłem(am) badanie

z Dr _____
(Nazwisko i imię lekarza drukowanymi literami)

i jestem świadomy(a) czego badanie dotyczy oraz na czym ono polega.

PACJENT

Wyrażam chęć uczestnictwa w badaniu.

Podpis _____ Kraków, dnia _____

LEKARZ

Wyjaśniłem/am cel i charakter badania wyżej podpisanemu/jej pacjentowi/pacjentce.

Podpis _____ Kraków, dnia _____

10.4. Pisemna zgoda na badania genetyczne



II KATEDRA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH
COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
Pracownia Biologii Molekularnej
31-066 Kraków, ul. Skawinska 8
tel. (+ 48 12) 430 52 66 wew. 303, 321

Nr badania

--	--	--	--	--

„Diagnostyka molekularna zmienności genetycznej *alfa-1 antytrypsyny*
i jej wartość kliniczna”

FORMULARZ ZGODY NA POBRANIE MATERIAŁU DO BADAŃ GENETYCZNYCH

.....
(Nazwisko i imię)

.....
(Data urodzenia)

Lekarz prowadzący badanie:

Wyrażam zgodę na pobranie krwi i przechowywanie DNA, który będzie wykorzystany do badań genetycznych. Jednocześnie oświadczam, że zostałem(am) poinformowany(a), że badania te będą dotyczyć oznaczania mutacji genów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem układu oddechowego. Dane medyczne uzyskane z tych badań wykorzystane zostaną jedynie do celów naukowych, a dostęp do nich będą miały tylko osoby prowadzące badanie.

Podpis badanego

Kraków, dnia

Podpis lekarza
prowadzącego badanie

Kraków, dnia

10.5. Pisemne wyrażenie zgody na informowanie o wynikach badań genetycznych i przetwarzanie danych osobowych



II KATEDRA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH
COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersytetu Jagiellońskiego
Pracownia Biologii Molekularnej
31-066 Kraków, ul. Skawińska 8
tel. (+ 48 12) 430 52 66 wew. 303, 321

Nr badania

--	--	--	--	--

„Diagnostyka molekularna zmienności genetycznej *alfa-1 antytrypsyny*
i jej wartość kliniczna”

FORMULARZ ZGODY NA PRZETWARZANIE DANYCH OSOBOWYCH I OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE INFORMOWANIA O WYNIKACH BADAŃ GENETYCZNYCH

.....
(Nazwisko i imię)

.....
(Data urodzenia)

.....
(Adres)

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych związanych z udziałem w badaniu naukowym dla potrzeb niezbędnych do realizacji celów tego eksperymentu badawczego (zgodnie z Ustawą z dnia 29 sierpnia 1997 r. „O ochronie danych osobowych”, Dz.U. nr 133, poz.883 z 1997 r. z późniejszymi zmianami).

Podpis Kraków, dnia

☐

TAK Proszę o poinformowanie mnie w przypadku stwierdzenia nieprawidłowych wyników badań genetycznych.

☐

NIE Proszę mnie nie informować pomimo stwierdzenia nieprawidłowych wyników badań genetycznych.

Podpis Kraków, dnia

Nr badania					
------------	--	--	--	--	--

ANKIETA UCZESTNIKA BADANIA

115

Czy występuje u Pani/Pana przewlekłe odkaszczanie plwociny?

☐ NIE ☐ TAK, od lat

Czy występuje u Pana/Pani duszność (oddychanie z wysiłkiem, ciężki oddech, głód powietrza, łapanie powietrza) postępująca, codzienna, nasilająca się w czasie wysiłku lub infekcji układu oddechowego?

☐ NIE ☐ TAK, od lat

Czy jest / był(a) Pan/Pani narażona na przemysłowe pyły i substancje chemiczne lub dym z pieców kuchennych i grzewczych?

☐ NIE ☐ TAK, przez lat obecnie ☐ Tak ☐ Nie

Astma ☐ choruje ☐ nie choruje

Czy miał(a) Pan/Pani napady lub nawracające napady świszczącego oddechu?

☐ NIE ☐ TAK

Czy miewa Pan/Pani w nocy męczący kaszel?

☐ NIE ☐ TAK

Czy występuje u Pana/pani świszczący oddech, uczucie ściskania w klatce lub kaszel po narażeniu na alergen wziewne lub zanieczyszczenie powietrza?

☐ NIE ☐ TAK

Czy zauważył(a) Pan/Pani, że przeziębienia „schodzą na płuca” lub trwają dłużej niż 10 dni?

☐ NIE ☐ TAK

Czy objawy ustępują pod wpływem właściwego leczenia p/astmatycznego?

☐ NIE ☐ TAK

Inne Czy choruje Pan/Pani na:

cukrzycę ☐ Nie ☐ Tak

nadciśnienie tętnicze ☐ Nie ☐ Tak

chorobę niedokrwienną serca ☐ Nie ☐ Tak

11. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AAT	alfa ₁ -antytrypsyna
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
CF	dopasowanie krzywej (<i>curve fit</i>)
CI	przedział ufności (<i>confidence interval</i>)
DTT	ditiotreitol
ER	retikulum endoplazmatyczne (<i>endoplasmic reticulum</i>)
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FEV₁	natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
FN	falszywie ujemne (<i>false negative</i>)
FP	falszywie dodatnie (<i>false positive</i>)
FRET	bezpromieniste przeniesienie energii fluorescencji (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
FVC	natężona pojemność życiowa
GINA	the Global Initiative for Asthma
GOLD	the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
GUS	Główny Urząd Statystyczny
IEF	ogniskowanie izoelektryczne (<i>isoelectric focusing</i>)
LPS	lipopolisacharyd
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	inhibitor proteaz (<i>protease inhibitor</i>)
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
PR3	proteinaza-3
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (<i>restriction fragments length polymorphism</i>)
RFU	jednostki fluorescencji względnej (<i>relative fluorescence units</i>)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
SD	odchylenie standardowe (<i>standard deviation</i>)
TBP	trójbutylofosfina
TN	prawdziwie ujemne (<i>true negative</i>)
TP	prawdziwie dodatnie (<i>true positive</i>)

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Proteazy serynowe, odpowiadające im inhibitory – serpiny oraz przykłady serpinopatii.	8
Tabela 2. Zakres stężenia AAT w surowicy w zależności od fenotypu	38
Tabela 3. Struktura ludności Polski i Krakowa według płci i wieku.....	43
Tabela 4. Liczebność osób wylosowanych w poszczególnych warstwach.	44
Tabela 5. Liczebności i odsetki osób wylosowanych i uczestniczących w grupach ze względu na płeć i wiek, oraz porównanie z populacją Krakowa.....	62
Tabela 6. Średnia i mediana wieku w grupie osób wylosowanych i uczestniczących.	63
Tabela 7. Podstawowe parametry opisujące losową próbę populacyjną.	64
Tabela 8. Odsetki osób palących tytoń obecnie, w przeszłości lub nigdy niepalących wśród kobiet i mężczyzn.....	66
Tabela 9. Współczynniki modelu regresji wielokrotnej wartości stężenia AAT w surowicy.	68
Tabela 10. Stężenie AAT w surowicy a palenie tytoniu i płeć.....	69
Tabela 11. Liczebności zdiagnozowanych genotypów wśród zebranej próby populacyjnej (n = 550) oraz połączonej populacji (n = 859).	77
Tabela 12. Częstości alleli AAT w losowej próbie populacji mieszkańców Krakowa (n = 859) wraz z 95% przedziałem ufności	77
Tabela 13. Częstości genotypów AAT w losowej próbie populacji Krakowa (n = 859).	78
Tabela 14. Oczekiwane liczebności genotypów AAT w populacji mieszkańców miasta Krakowa. ...	78
Tabela 15. Oczekiwane liczebności genotypów AAT w populacji Polski.	79
Tabela 16. Prewalencja występowania poszczególnych genotypów niedoborowych.	80
Tabela 17. Średnie wartości stężenia AAT w surowicy w zależności od zdiagnozowanego genotypu.	80
Tabela 18. Różnica w średnim stężeniu AAT w surowicy pomiędzy poszczególnymi genotypami. ..	81
Tabela 19. Wyniki prawdziwie dodatnie (TP), fałszywie dodatnie (FP), fałszywie ujemne (FN) i prawdziwie ujemne (TN) przy zastosowaniu pomiaru stężenia białka AAT w diagnostyce niedoborów częściowych.	82
Tabela 20. Parametry charakteryzujące skuteczność diagnostyczną pomiaru stężenia AAT w surowicy w wykrywaniu niedoborów częściowych.....	82
Tabela 21. Wyniki prac badawczych oceniających częstości wariantów niedoborowych AAT w polskiej populacji.	94

13. SPIS RYCIN

Rycina 1. Carl-Bertil Laurell (1919-2001).....	6
Rycina 2. Obraz elektroforetyczny białek surowicy osoby z ciężkim niedoborem AAT (brak prążka α_1) i prawidłowy (po prawej).	7
Rycina 3. Proces tworzenia kompleksu proteaza – serpina.....	9
Rycina 4. Chromosom 14 z zaznaczeniem lokalizacji genu AAT – <i>PI locus</i>	10
Rycina 5. Organizacja genu AAT.	11
Rycina 6. Model glikoform AAT identyfikowanych za pomocą IEF.	12
Rycina 7. Schemat budowy natywnej cząsteczki AAT.....	13
Rycina 8. Lokalizacja wariantów typu <i>null</i>	17
Rycina 9. Schemat transkrypcji mRNA w przypadku hepatocytów i makrofagów.	20
Rycina 10. Mutacja Z i polimeryzacja cząsteczek AAT.	21
Rycina 11. Patomechanizm niedoborów AAT.....	22
Rycina 12. Inkluzje AAT w obrębie hepatocytów.	23
Rycina 13. Model karcinogenezy w wątrobie osób z ciężkim niedoborem AAT.	26
Rycina 14. Zasady działania poszczególnych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych w reakcji <i>real-time</i> PCR.	40
Rycina 15. Podział administracyjny miasta Krakowa. Zaznaczono miejsce rekrutacji ochotników....	42
Rycina 16. Ludność Krakowa zameldowana na pobyt stały oraz gęstość zaludnienia.	43
Rycina 17. Schemat amplifikacji regionu obejmującego mutację S. Dolny starter hybrydujący tuż za miejscem mutacji zawiera w drugiej pozycji nukleotyd mutageny.	48
Rycina 18. Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji S w przypadku allela prawidłowego – brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny <i>RsaI</i> i ampikon (167 bp) nie ulega trawieniu.....	49
Rycina 19. Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji S w przypadku allela niedoborowego – sekwencja 5' GTAC 3' jest rozpoznawana przez enzym restrykcyjny <i>RsaI</i> i ampikon (167 bp) ulega trawieniu na fragmenty: 143 i 24 par zasad.....	49
Rycina 20. Schemat amplifikacji regionu obejmującego mutację Z. Górny starter hybrydujący tuż przez miejscem mutacji zawiera w przedostatniej pozycji nukleotyd mutageny.	50
Rycina 21. Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji Z w przypadku allela prawidłowego – sekwencja 5' TCGA 3' jest rozpoznawana przez enzym restrykcyjny <i>TaqI</i> i ampikon (160 bp) ulega trawieniu na fragmenty 137 i 23 par zasad.....	50
Rycina 22. Fragment produktu PCR obejmujący miejsce mutacji Z w przypadku allela niedoborowego – brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny <i>TaqI</i> i ampikon (160 bp) nie ulega trawieniu.....	51
Rycina 23. Schemat reakcji <i>real-time</i> PCR, celem detekcji mutacji S, z użyciem pary sond oligonukleotydowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie specyficznych względem sekwencji.	54
Rycina 24. Profil termiczny w diagnostyce mutacji S metodą <i>real-time</i> PCR.....	54
Rycina 25. Schemat reakcji <i>real-time</i> PCR, celem detekcji mutacji Z, z użyciem pary sond oligonukleotydowych podwójnie znakowanych fluorescencyjnie specyficznych względem sekwencji.	55
Rycina 26. Alkilacja cysteiny w procesie przygotowywania próbek surowicy celem ogniskowania izoelektrycznego.	56

Rycina 27. Rozkład wieku (w latach) w grupie osób wylosowanych i uczestniczących z podziałem na mężczyzn i kobiety.....	62
Rycina 28. Wyniki genotypowania metodą analizy miejsc restrykcyjnych (RFLP) i obrazowaniem produktu na żelach agarozowych z bromkiem etydyny.	71
Rycina 29. Fluorogram obrazujący wyniki genotypowania AAT metodą analizy miejsc restrykcyjnych (RFLP).	72
Rycina 30. Średnie stężenie AAT w surowicy i odchylenie standardowe w przypadku poszczególnych genotypów.	81
Rycina 31. Fenotypowanie AAT za pomocą ogniskowania izoelektrycznego – wzór prążków.	85
Rycina 32. Wynik fenotypowania AAT metodą ogniskowania izoelektrycznego białka w wąskim zakresie pH (4,2 – 4,9) w żelach poliakrylamidowych następnie poddanych srebrzeniu.	86
Rycina 33. Częstości alleli niedoborowych w poszczególnych obszarach Polski.....	95
Rycina 34. Częstości alleliczne PI*S i PI*Z w Europie.....	97

14. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Profil termiczny w diagnostyce mutacji Z metodą <i>real-time</i> PCR.....	55
Wykres 2. Współczynniki odpowiedzi w I fazie rekrutacji losowo wybranych mieszkańców Krakowa w poszczególnych grupach ze względu na płeć i wiek.	61
Wykres 3. Średni wiek z 95% przedziałem ufności w zależności od płci i grupy osób wylosowanych i uczestniczących.....	64
Wykres 4. Średnia ilość wypalanych obecnie papierosów (w paczkach/dzień) z 95% przedziałem ufności w zależności od płci i przedziału wiekowego.....	67
Wykres 5. Zależność stężenia AAT od płci i palenia tytoniu.....	70
Wykres 6. Niestabilność termiczna sondy specyficznej dla allela „dzikiego” w zestawie do wykrywania mutacji S, obserwowana od pierwszych cykli reakcji, nawet bez dodania polimerazy do mieszaniny.	73
Wykres 7. Sonda dla allela „dzikiego” w zestawie do wykrywania mutacji S wykazuje pewną specyficzność, niemniej wyniki są trudne do interpretacji.	73
Wykres 8. Przyrosty fluorescencji dla sondy specyficznej dla allela niedoborowego w zestawie do wykrywania mutacji S – prawidłowe, specyficzne względem analizowanych genotypów krzywe.	74
Wykres 9. Przyrosty fluorescencji barwnika ROX (po odjęciu sygnału tła i dopasowaniu krzywej). .	74
Wykres 10. Przyrosty fluorescencji dla barwnika FAM (po odjęciu sygnału tła i dopasowaniu krzywej).	75
Wykres 11. Dyskryminacja genotypów na wykresie zależności fluorescencji barwnika ROX vs FAM.	76
Wykres 12. Krzywa ROC.....	84

15. PIŚMIENNICTWO

1. Eriksson S. Alpha 1-antitrypsin deficiency: lessons learned from the bedside to the gene and back again. Historic perspectives. Chest 1989;95:181-9.
2. Carrell, R. W. What we owe to α_1 -Antitrypsin and to Carl-Bertil Laurell. COPD 1[1], 71-84. 2004.
3. Schultze HE, Heide K, Haupt H. [α 1-Antitrypsin from human serum]. Klin Wochenschr 1962;40:427-9.:427-9.
4. Laurell, C. B. and Erikson, S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. Scand.J.Clin.Invest 15, 132-140. 1963.
5. Fagerhol MK, Laurell CB. The polymorphism of "prealbumins" and alpha-1-antitrypsin in human sera. Clin Chim Acta 1967;16:199-203.
6. Kueppers F, Bearn AG. A possible experimental approach to the association of hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. Proc Soc Exp Biol Med 1966;121:1207-9.
7. Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 1968;128:1137-55.
8. Ohlsson K. Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma alpha 1 -antitrypsin. Scand J Clin Lab Invest 1971;28:251-3.
9. Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha1-antitrypsin deficiency, Pi Z. Acta Med Scand 1978;204:345-51.
10. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. J Lab Clin Med 1969;73:934-9.
11. Szczeklik A, Teresiak T, Kolaczowska B. [Alpha-1-antitrypsin and antithrombin 3 deficiency in a case of pulmonary emphysema]. Pol Arch Med Wewn 1971;47:407-10.
12. Szczeklik A, Stankowska K, Frydecka I. Cardiopulmonary function in 1 -antitrypsin heterozygotes exposed to severe air pollution. Am Rev Respir Dis 1973;107:289-91.
13. Szczeklik A, Turowska B, Czerniawska-Mysik G, Opolska B, Nizankowska E. [Alpha-1 antitrypsin level and phenotype Pi in healthy subjects and patients with asthma]. Pol Arch Med Wewn 1974;52:283-90.

14. Szczeklik A, Turowska B, Czerniawska-Mysik G, Opolska B, Nizankowska E. Serum alpha 1-antitrypsin in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:487-90.
15. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1994;269:15957-60.
16. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001;276:33293-6.
17. Stratikos E, Gettins PG. Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:453-8.
18. Stratikos E, Gettins PG. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4808-13.
19. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000;407:923-6.
20. Zhou A, Carrell RW, Huntington JA. The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *J Biol Chem* 2001;276:27541-7.
21. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, Levine RL. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem* 2000;275:27258-65.
22. Beatty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980;255:3931-4.
23. Lee JH, Brantly M. Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respir Med* 2000;94 Suppl C:S7-11.:S7-11.
24. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans* 2002;30:93-8.
25. Hodges LC, Chan SK. Locations of oligosaccharide chains in human alpha 1-protease inhibitor and oligosaccharide structures at each site. *Biochemistry* 1982;21:2805-10.
26. Kolarich D, Weber A, Turecek PL, Schwarz HP, Altmann F. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha(1)-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics* 2006;6:3369-80.

27. Ludeman JP, Whisstock JC, Hopkins PC, Le Bonniec BF, Bottomley SP. Structure of a serpin-enzyme complex probed by cysteine substitutions and fluorescence spectroscopy. *Biophys J* 2001;80:491-7.
28. DeMeo DL, Silverman EK. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004;59:259-64.
29. Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet* 1989;5:411-7.
30. Curiel DT, Chytil A, Courtney M, Crystal RG. Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264----Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. *J Biol Chem* 1989;264:10477-86.
31. Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J et al. Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest* 1999;103:999-1006.
32. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1987;80:1366-74.
33. Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53-->Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem* 1993;268:15333-5.
34. Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW et al. alpha 1-Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *J Biol Chem* 1995;270:16864-70.
35. Okayama H, Brantly M, Holmes M, Crystal RG. Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele. *Am J Hum Genet* 1991;48:1154-8.
36. Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 1983;309:694-8.
37. Lee J, Novoradovskaya N, Rundquist B, Redwine J, Saltini C, Brantly M. Alpha 1-antitrypsin nonsense mutation associated with a retained truncated protein and reduced mRNA. *Mol Genet Metab* 1998;63:270-80.
38. Hutchison DC. Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med* 1998;92:367-77.
39. Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: allelic association and a unique haplotype associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet* 1994;55:126-33.

40. Cox DW, Woo SL, Mansfield T. DNA restriction fragments associated with alpha 1-antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PI Z. *Nature* 1985;316:79-81.
41. Seixas S, Garcia O, Trovada MJ, Santos MT, Amorim A, Rocha J. Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism. *Hum Genet* 2001;108:20-30.
42. Blanco I, Fernandez E, Bustillo EF. Alpha-1-antitrypsin PI phenotypes S and Z in Europe: an analysis of the published surveys. *Clin Genet* 2001;60:31-41.
43. de Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in southern Europe: France, Italy, Portugal and Spain. *Clin Genet* 2003;63:490-509.
44. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 2006;27:77-84.
45. de Serres FJ, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in North America and Australia/New Zealand: Australia, Canada, New Zealand and the United States of America. *Clin Genet* 2003;64:382-97.
46. Blanco I, Bustillo EF, Rodriguez MC. Distribution of alpha1-antitrypsin PI S and PI Z frequencies in countries outside Europe: a meta-analysis. *Clin Genet* 2001;60:431-41.
47. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest* 2002;122:1818-29.
48. de Serres FJ, Luisetti M, Ferrarotti I, Blanco I, Fernandez-Bustillo E. Alpha-1 antitrypsin deficiency in Italy: regional differences of the PIS and PIZ deficiency alleles. *Monaldi Arch Chest Dis* 2005;63:133-41.
49. Perlmutter DH, Cole FS, Kilbridge P, Rossing TH, Colten HR. Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:795-9.
50. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J* 1987;6:2767-71.
51. Perlmutter DH, May LT, Sehgal PB. Interferon beta 2/interleukin 6 modulates synthesis of alpha 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J Clin Invest* 1989;84:138-44.
52. Perlmutter DH, Punsal PI. Distinct and additive effects of elastase and endotoxin on expression of alpha 1 proteinase inhibitor in mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1988;263:16499-503.

53. Perlmutter DH, Travis J, Punsal PI. Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha 1-proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ alpha 1 PI deficiency. *J Clin Invest* 1988;81:1774-80.
54. Perlmutter DH, Dinarello CA, Punsal PI, Colten HR. Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest* 1986;78:1349-54.
55. Cichy J, Potempa J, Travis J. Biosynthesis of alpha1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:8250-5.
56. Perlmutter DH, Daniels JD, Auerbach HS, Schryver-Kecskemeti K, Winter HS, Alpers DH. The alpha 1-antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. *J Biol Chem* 1989;264:9485-90.
57. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997;350:134-8.
58. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med* 2002;346:45-53.
59. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta* 2001;1535:221-35.
60. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002;110:1585-90.
61. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 1992;357:605-7.
62. Lin L, Schmidt B, Teckman J, Perlmutter DH. A naturally occurring nonpolymerogenic mutant of alpha 1-antitrypsin characterized by prolonged retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2001;276:33893-8.
63. Wu Y, Whitman I, Molmenti E, Moore K, Hippenmeyer P, Perlmutter DH. A lag in intracellular degradation of mutant alpha 1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9014-8.
64. Teckman JH, Burrows J, Hidvegi T, Schmidt B, Hale PD, Perlmutter DH. The proteasome participates in degradation of mutant alpha 1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum of hepatoma-derived hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:44865-72.
65. Teckman JH, Perlmutter DH. Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G961-G974.
66. Kamimoto T, Shoji S, Hidvegi T, Mizushima N, Umebayashi K, Perlmutter DH, Yoshimori T. Intracellular inclusions containing mutant alpha 1-

antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J Biol Chem* 2005.

67. Teckman JH, An JK, Blumenkamp K, Schmidt B, Perlmutter D. Mitochondrial autophagy and injury in the liver in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G851-G862.
68. Perlmutter DH. Liver injury in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Clin Liver Dis* 2000;4:387-408, vi.
69. Rudnick DA, Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology* 2005;42:514-21.
70. Perlmutter DH, Schlesinger MJ, Pierce JA, Punsal PI, Schwartz AL. Synthesis of stress proteins is increased in individuals with homozygous PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease. *J Clin Invest* 1989;84:1555-61.
71. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the Diagnosis and Management of Individuals with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:818-900.
72. Teckman JH, Qu D, Perlmutter DH. Molecular pathogenesis of liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1996;24:1504-16.
73. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986;20;314:736-9.
74. Massi G. Pathogenesis and pathology of liver disease associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1996;110:251S-5S.
75. Remold-O'Donnell E, Chin J, Alberts M. Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5635-9.
76. Korkmaz B, Poutrain P, Hazouard E, de MM, Attucci S, Gauthier FL. Competition between elastase and related proteases from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:553-9.
77. Desrochers PE, Mookhtiar K, Van Wart HE, Hasty KA, Weiss SJ. Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol Chem* 1992;267:5005-12.
78. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA. Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:670-4.
79. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in

- emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol* 2005;166:377-86.
80. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, McElvaney NG. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 2004;125:1952-7.
 81. Banda MJ, Rice AG, Griffin GL, Senior RM. The inhibitory complex of human alpha 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J Exp Med* 1988;167:1608-15.
 82. Parmar JS, Mahadeva R, Reed BJ, Farahi N, Cadwallader KA, Keogan MT et al. Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:723-30.
 83. Drozd R, Naskalski JW. Inactivation and denaturation of some proteins by enzyme system: myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide. *Folia Histochem Cytobiol* 1993;31:71-5.
 84. Hubbard RC, Fells G, Gadek J, Pacholok S, Humes J, Crystal RG. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B₄ by alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1991;88:891-7.
 85. Rouhani F, Paone G, Smith NK, Krein P, Barnes P, Brantly ML. Lung neutrophil burden correlates with increased pro-inflammatory cytokines and decreased lung function in individuals with alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* 2000;117:250S-1S.
 86. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax* 2002;57:709-14.
 87. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P et al. A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1222-8.
 88. Stoller JK. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:92-3.
 89. Lomas DA. The Selective Advantage of Alpha-1-antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2006.
 90. Hutchison DC, Cooper D. Alpha-1-antitrypsin deficiency: smoking, decline in lung function and implications for therapeutic trials. *Respir Med* 2002;96:872-80.
 91. Seersholm N, Kok-Jensen A. Clinical features and prognosis of life time non-smokers with severe alpha 1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 1998;53:265-8.

92. Stoller JK, Tomashefski J, Jr., Crystal RG, Arroliga A, Strange C, Killian DN et al. Mortality in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin: findings from the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 2005;127:1196-204.
93. Dawkins PA, Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. Predictors of mortality in alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2003;58:1020-6.
94. Shaker SB, Stavngaard T, Stolk J, Stoel B, Dirksen A. Alpha1-antitrypsin deficiency. 7: Computed tomographic imaging in alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:986-91.
95. Eden E, Mitchell D, Mehlman B, Khouli H, Nejat M, Grieco MH, Turino GM. Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:68-74.
96. Eden E, Hammel J, Rouhani FN, Brantly ML, Barker AF, Buist AS et al. Asthma features in severe alpha1-antitrypsin deficiency: experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 2003;123:765-71.
97. Eden E, Strange C, Holladay B, Xie L. Asthma and allergy in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med* 2006.
98. Plusa T, Wasek Z. Immunobiochemical evaluation of bronchoalveolar lavage (BAL) in atopic bronchial asthma, chronic bronchitis and bronchiectasis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1987;15:209-13.
99. Plusa T, Tchorzewski H, Raczka A. Interaction of lysosomal enzymes and their natural inhibitors in bronchoalveolar lavage fluid and serum in atopic bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987;35:49-55.
100. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M et al. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:505-11.
101. von Ehrenstein OS, Maier EM, Weiland SK, Carr D, Hirsch T, Nicolai T et al. Alpha1 antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. *Arch Dis Child* 2004;89:230-1.
102. van V, I, Ten BA, van der Linden AC, Rabe KF, Bel EH. Deficient alpha-1-antitrypsin phenotypes and persistent airflow limitation in severe asthma. *Respir Med* 2006;..
103. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin MZ heterozygotes: A longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med* 2002;136:270-9.
104. Hersh CP, Dahl M, Ly NP, Berkey CS, Nordestgaard BG, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:843-9.

105. Dahl M, Hersh CP, Ly NP, Berkey CS, Silverman EK, Nordestgaard BG. The protease inhibitor PI*S allele and COPD: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2005;26:67-76.
106. Sandford AJ, Weir TD, Spinelli JJ, Pare PD. Z and S mutations of the alpha1-antitrypsin gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:287-91.
107. Dahl M, Nordestgaard BG, Lange P, Vestbo J, Tybjaerg-Hansen A. Molecular diagnosis of intermediate and severe alpha(1)-antitrypsin deficiency: MZ individuals with chronic obstructive pulmonary disease may have lower lung function than MM individuals. *Clin Chem* 2001;47:56-62.
108. Requena L, Sanchez YE. Panniculitis. Part II. Mostly lobular panniculitis. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:325-61.
109. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, Gray WR, Gray BH, Hoidal JR. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J Biol Chem* 1991;266:9540-8.
110. Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcgamma receptors. *J Clin Invest* 1997;100:1416-24.
111. Rooney CP, Taggart C, Coakley R, McElvaney NG, O'Neill SJ. Anti-proteinase 3 antibody activation of neutrophils can be inhibited by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:747-54.
112. Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S. Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J Intern Med* 1994;236:543-8.
113. Griffith ME, Lovegrove JU, Gaskin G, Whitehouse DB, Pusey CD. C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:438-43.
114. Esnault VL, Testa A, Audrain M, Roge C, Hamidou M, Barrier JH et al. Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int* 1993;43:1329-32.
115. Callea F, Gregorini G, Sinico A, Gonzales G, Bossolasco M, Salvidio G et al. alpha 1-Antitrypsin (AAT) deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis: genetic and clinical implications. *Eur J Clin Invest* 1997;27:696-702.
116. Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S. The PiZ gene of alpha 1-antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. *Kidney Int* 1995;48:844-50.

117. Audrain MA, Sesboue R, Baranger TA, Elliott J, Testa A, Martin JP et al. Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:39-44.
118. Yang P, Bamlet WR, Sun Z, Ebbert JO, Aubry MC, Taylor WR et al. Alpha1-antitrypsin and neutrophil elastase imbalance and lung cancer risk. *Chest* 2005;128:445-52.
119. Yang P, Cunningham JM, Halling KC, Lesnick TG, Burgart LJ, Wiegert EM et al. Higher risk of mismatch repair-deficient colorectal cancer in alpha(1)-antitrypsin deficiency carriers and cigarette smokers. *Mol Genet Metab* 2000;71:639-45.
120. Cohen JR, Sarfati I, Ratner L, Tilson D. Alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Surg Res* 1990;49:319-21.
121. Elzouki AN, Ryden AA, Lanne T, Sonesson B, Eriksson S. Is there a relationship between abdominal aortic aneurysms and alpha1-antitrypsin deficiency (PiZ)? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:149-54.
122. Stakisaitis D, Basys V, Benetis R. Does alpha-1-proteinase inhibitor play a protective role in coronary atherosclerosis? *Med Sci Monit* 2001;7:701-11.
123. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Sillesen H, Jensen G, Steffensen R, Nordestgaard BG. Blood pressure, risk of ischemic cerebrovascular and ischemic heart disease, and longevity in alpha(1)-antitrypsin deficiency: the Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 2003;107:747-52.
124. Talmud PJ, Martin S, Steiner G, Flavell DM, Whitehouse DB, Nagl S et al. Progression of atherosclerosis is associated with variation in the alpha1-antitrypsin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:644-9.
125. Mahadeva R, Dafforn TR, Carrell RW, Lomas DA. 6-mer peptide selectively anneals to a pathogenic serpin conformation and blocks polymerization. Implications for the prevention of Z alpha(1)-antitrypsin-related cirrhosis. *J Biol Chem* 2002;277:6771-4.
126. Parfrey H, Mahadeva R, Ravenhill NA, Zhou A, Dafforn TR, Foreman RC, Lomas DA. Targeting a surface cavity of alpha 1-antitrypsin to prevent conformational disease. *J Biol Chem* 2003;278:33060-6.
127. Stoller JK, Aboussouan LS. alpha1-Antitrypsin deficiency . 5: intravenous augmentation therapy: current understanding. *Thorax* 2004;59:708-12.
128. Abusriwil H, Stockley RA. Alpha-1-antitrypsin replacement therapy: current status. *Curr Opin Pulm Med* 2006;12:125-31.
129. Juvelekian GS, Stoller JK. Augmentation therapy for alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Drugs* 2004;64:1743-56.

130. Dirksen A, Dijkman JH, Madsen F, Stoel B, Hutchison DC, Ulrik CS et al. A randomized clinical trial of alpha(1)-antitrypsin augmentation therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1468-72.
131. Gildea TR, Shermock KM, Singer ME, Stoller JK. Cost-effectiveness analysis of augmentation therapy for severe alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1387-92.
132. Mullins CD, Wang J, Stoller JK. Major components of the direct medical costs of alpha1-antitrypsin deficiency. *Chest* 2003;124:826-31.
133. Sandhaus RA. alpha1-Antitrypsin deficiency . 6: new and emerging treatments for alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:904-9.
134. Jeppsson JO, Franzen B. Typing of genetic variants of alpha 1-antitrypsin by electrofocusing. *Clin Chem* 1982;28:219-25.
135. Nowicki ML, Freier EF. Improved method for identifying alpha 1-antitrypsin Pi M subtypes by isoelectric focusing in agarose. *Clin Chem* 1990;36:1815-9.
136. Buffone GJ, Stennis BJ, Schimbor CM. Isoelectric focusing in agarose: classification of genetic variants of alpha 1-antitrypsin. *Clin Chem* 1983;29:328-31.
137. Massi G, Marano G, Patalano F, Auconi P. Silver-stained phenotyping of alpha 1-antitrypsin in dried blood and serum specimens. *Clin Chem* 1984;30:1674-6.
138. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003;4:1120-8.
139. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* 2006;363:32-47.
140. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001;31:1106-1.
141. Marras SA, Tyagi S, Kramer FR. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin Chim Acta* 2006;363:48-60.
142. Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, Brown T. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E96.
143. Bracha, Cz. Teoretyczne podstawy metody reprezentacyjnej. Wydawnictwa Naukowe PWN . 1996. Warszawa.
144. Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* 1997;22:550-3.

145. Heukeshoven, J. and Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112. 1985.
146. Zielinski A. [Sample selection in epidemiologic studies]. *Przegl Epidemiol* 2002;56:489-98.
147. Kalsbeek W, Heiss G. Building bridges between populations and samples in epidemiological studies. *Annu Rev Public Health* 2000;21:147-69.:147-69.
148. Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G. High-speed detection of the two common alpha(1)-antitrypsin deficiency alleles Pi*Z and Pi*S by real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin Chem* 1999;45:1872-5.
149. Ortiz-Pallardo ME, Zhou H, Fischer HP, Neuhaus T, Sachinidis A, Vetter H et al. Rapid analysis of alpha1-antitrypsin PiZ genotype by a real-time PCR approach. *J Mol Med* 2000;78:212-6.
150. von Ahsen N, Oellerich M, Schutz E. Use of two reporter dyes without interference in a single-tube rapid-cycle PCR: alpha(1)-antitrypsin genotyping by multiplex real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 2000;46:156-61.
151. Behrens M, Lange R. A highly reproducible and economically competitive SNP analysis of several well characterized human mutations. *Clin Lab* 2004;50:305-16.
152. Andolfatto S, Namour F, Garnier AL, Chabot F, Gueant JL, Aimone-Gastin I. Genomic DNA extraction from small amounts of serum to be used for alpha1-antitrypsin genotype analysis. *Eur Respir J* 2003;21:215-9.
153. Braun A, Meyer P, Cleve H, Roscher AA. Rapid and simple diagnosis of the two common alpha 1-proteinase inhibitor deficiency alleles Pi*Z and Pi*S by DNA analysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:761-4.
154. Lam CW, Pang CP, Poon PM, Yin CH, Bharathi G. Rapid screening for alpha1-antitrypsin Z and S mutations. *Clin Chem* 1997;43:403-4.
155. Tazelaar JP, Friedman KJ, Kline RS, Guthrie ML, Farber RA. Detection of alpha 1-antitrypsin Z and S mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1992;38:1486-8.
156. Ferrarotti I, Zorzetto M, Scabini R, Mazzola P, Campo I, Luisetti M. A novel method for rapid genotypic identification of alpha 1-antitrypsin variants. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:160-3.
157. Orru G, Faa G, Pillai S, Pilloni L, Montaldo C, Pusceddu G et al. Rapid PCR real-time genotyping of M-Malton alpha1-antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:237-42.
158. Lang T, Muhlbauer M, Strobelt M, Weidinger S, Hadorn HB. Alpha-1-antitrypsin deficiency in children: liver disease is not reflected by low serum

levels of alpha-1-antitrypsin - a study on 48 pediatric patients. *Eur J Med Res* 2005;10:509-14.

159. Steiner SJ, Gupta SK, Croffie JM, Fitzgerald JF. Serum levels of alpha1-antitrypsin predict phenotypic expression of the alpha1-antitrypsin gene. *Dig Dis Sci* 2003;48:1793-6.
160. Pittschieler K. Rare alpha-1-antitrypsin phenotypes and liver-test abnormalities during infancy. *Acta Paediatr* 2001;90:406-8.
161. Opolska B. [Studies on the occurrence of PI system phenotypes in the population of Southern Poland]. *Przegl Lek* 1974;31:851-4.
162. Kowalska A, Rujner J. [Polymorphism locus Pi (alpha1-antitrypsin) of residents in the Poznan province]. *Pol Tyg Lek* 1994;49:195-7.
163. Titenko-Holland NV, Kowalska A. Alpha-1-antitrypsin (PI) subtypes in Russians and Poles. *Hum Hered* 1992;42:384-6.
164. Kowalska A, Rujner J, Titenko-Holland NV, Pilacik B. Alpha-1-antitrypsin subtypes in Polish newborns. *Hum Hered* 1995;45:351-4.
165. Walter H, nker-Hopfe H, Lemmermann M, Lorenz M. Investigations on the variability of four genetic serum protein markers in Poland. *Z Morphol Anthropol* 1992;79:203-14.
166. Pilacik B. [Rare alpha 1-antitrypsin phenotypes in the Polish population and the problems associated with their detection]. *Pol Tyg Lek* 1988;20;43:814-7.
167. Luisetti M, Seersholm N. Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:164-9.
168. Petridou E, Chapuis-Cellier C, Roukas K, Lan SJ, Tzonou A, Trichopoulos D. Tobacco smoking and other factors in relation to serum alpha-1-antitrypsin. *Hum Biol* 1993;65:425-32.
169. van Antwerpen VL, Theron AJ, Richards GA, Steenkamp KJ, van der Merwe CA, van der WR, Anderson R. Vitamin E, pulmonary functions, and phagocyte-mediated oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Free Radic Biol Med* 1995;18:935-41.
170. Faarvang HJ, Lauritsen OS. Increase of trypsin inhibitor in serum during pregnancy. *Nature* 1963;199:290-1.
171. Laurell CB, Rannevik G. A comparison of plasma protein changes induced by danazol, pregnancy, and estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:719-25.
172. Laurell CB, Kullander S, Thorell J. Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:337-43.

173. Szczeklik, A., Teresiak, T., Kolaczowska, B. Zachowanie się antytrypsyny alfa1 w surowicy krwi u ludzi zdrowych i chorych na rozedmę płuc. *Pol.Tyg.Lek.* 41, 1569-1571. 1971.
174. Brantly ML, Wittes JT, Vogelmeier CF, Hubbard RC, Fells GA, Crystal RG. Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes. *Chest* 1991;100:703-8.
175. de Serres FJ. Alpha-1 antitrypsin deficiency is not a rare disease but a disease that is rarely diagnosed. *Environ Health Perspect* 2003;111:1851-4.
176. Campos MA, Wanner A, Zhang G, Sandhaus RA. Trends in the diagnosis of symptomatic patients with alpha1-antitrypsin deficiency between 1968 and 2003. *Chest* 2005;128:1179-86.
177. McElvaney NG, Stoller JK, Buist AS, Prakash UB, Brantly ML, Schluchter MD, Crystal RD. Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest* 1997;111:394-403.
178. Luisetti M. Introduction: the history of the Alpha One International Registry (A.I.R.). *Respir Med* 2000;94 Suppl C:S1-2.:S1-S2.
179. Stoller JK, Brantly M, Fleming LE, Bean JA, Walsh J. Formation and current results of a patient-organized registry for alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* 2000;118:843-8.
180. Luisetti M, Massi G, Massobrio M, Guarraci P, Menchicchi FM, Beccaria M, Balbi B. A national program for detection of alpha 1-antitrypsin deficiency in Italy. Gruppo I.D.A. *Respir Med* 1999;93:169-72.
181. Costa X, Jardi R, Rodriguez F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzalez C et al. Simple method for alpha1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *Eur Respir J* 2000;15:1111-5.