Radosław Struniawski, Adam Szpechciński, Joanna Chorostowska-Wynimko

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: dr hab. med. Joanna Chorostowska-Wynimko

Diagnostyka molekularna niedoboru alfa-1-antytrypsyny w praktyce klinicznej

Molecular diagnostics of alpha-1-antitrypsine deficiency in clinical practice

Abstract

The deficiency of serine protease inhibitor, alpha-1-antitrypsin (AATD), is genetically determined defect that increases the risk of lung and liver disease development. The results of recent epidemiological studies indicate the overwhelming majority of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency still remain undiagnosed. The complete laboratory diagnosis of AATD is based on combination of quantitative and qualitative methods. The measurment of plasma/serum AAT concentration is always the initial test performed in the clinically suspected individuals. Nevertheless, only the AAT phenotype or genotype identification allows the full medical verification of the diagnosis. Among the various techniques of either AAT variant phenotyping or genotyping accepted by reference medical centers worldwide, the isoelectric focusing, real-time-PCR and restriction fragment-length polymorphism PCR (RFLP-PCR) are "considered the most effective" performed the most commonly. The AAT diagnostics in Poland still awaits for introduction into clinical routine. The aim of present review is to outline the major methods of AATD diagnosis and discuss with the special issuing of their potential benefits and disadvantages.

Key words: alpha-1-antitrypsin, deficiency, molecular diagnostics, phenotyping, genotyping, diagnostic algorithm

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 253–264

Streszczenie

Niedobór alfa-1-antytrypsyny (AATD, *alpha-1-antitrypsin deficiency*), inhibitora proteaz serynowych, jest genetycznie uwarunkowanym defektem zwiększającym ryzyko rozwoju chorób płuc i wątroby. Na podstawie wyników badań epidemiologicznych z ostatnich lat wykazano, że większość osób z tym deficytem pozostaje wciąż niezdiagnozowana. Pełna diagnostyka kliniczna AATD oparta jest na kombinacji analiz ilościowych i jakościowych. Badaniem wstępnym wykonywanym u osób z podejrzeniem deficytu jest pomiar stężenia inhibitora w surowicy/osoczu krwi. Pełną weryfikację rozpoznania klinicznego AATD zapewnia jednak dopiero identyfikacja fenotypu lub genotypu alfa-1-antytrypsyny. Spośród wielu technik fenotypowania i genotypowania wariantów AAT, uznawanych przez referencyjne ośrodki diagnostyczne na świecie, ogniskowanie izoelektryczne, *real-time* PCR i analiza restrykcyjna produktu PCR (RFLP-PCR, *restriction fragment-length polymorphism*) stosowane są najpowszechniej. W Polsce wciąż nie wykonuje się rutynowo badań w kierunku niedoboru alfa-1-antytrypsyny. Celem niniejszej pracy poglądowej jest przedstawienie najważniejszych metod diagnozowania AATD, ze szczegółowym omówieniem zalet i problemów związanych z wyborem danej techniki oznaczania wariantów AAT. Omówiono również zalecany algorytm postępowania diagnostycznego.

Słowa kluczowe: alfa-1-antytrypsyna, niedobór, diagnostyka molekularna, fenotypowanie, genotypowanie, algorytm postępowania

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 253–264

Adres do korespondencji: Radosław Struniawski, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (022) 431 21 05, faks: (022) 431 23 58, e-mail: r.struniawski@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 5.12.2007 r.
Copyright © 2008 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wstęp

Niedobór alfa-1-antytrypsyny (AATD, *alpha-1 antitrypsine deficiency*) jest jednym z najczęstszych zaburzeń genetycznych rasy białej [1]. Defekt ten charakteryzuje się ilościowym i/lub funkcjonalnym deficytem osoczowego inhibitora proteaz serynowych, zwiększającym ryzyko rozwoju chorób płuc i wątroby. Klasyczna postać tego niedoboru (genotyp PIZZ) występuje z różną częstością w poszczególnych regionach świata. W populacji europejskiej stwierdza się ją średnio u 1 na 4727 osób [2]. W Polsce częstość ciężkiego AATD szacuje się na 1/9110 [3].

Wśród pacjentów i zakładów opieki zdrowotnej w Polsce i na świecie stan wiedzy na temat tego zaburzenia jest nadal bardzo niski, mimo jego powszechnego występowania. Jak wykazano na podstawie badań, większość osób z deficytem alfa-1-antytrypsyny pozostaje wciąż niezdiagnozowana. W samych tylko Stanach Zjednoczonych liczbę przypadków z poważnym AATD szacuje się na ponad 100 000, lecz rozpoznaje się tylko niecałe 6% [4]. Podobna sytuacja ma miejsce w większości krajów europejskich [1]. W Polsce nie wykonuje się rutynowo diagnostyki niedoboru AATD.

Trudności związane z wczesnym diagnozowaniem tego zaburzenia powodują, że czas od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych deficytu AAT a postawieniem rozpoznania wynosi kilka lat (średnia na świecie — 5,6 roku) [5]. W konsekwencji większość chorych z AATD traci szansę nie tylko na istotną zmianę swojego stylu życia, ale także na leczenie zapobiegające progresji zmian w obrębie układu oddechowego.

W ciągu 44 lat, które minęły od opisania przez Laurella i Erikssona pierwszych przypadków chorych z niedoborem alfa-1-antytrypsyny, postęp technologiczny, jaki się dokonał w metodyce badań molekularnych, sprawił, że dostępnych jest wiele metod służących do identyfikacji AATD. Współczesne techniki pozwalają nie tylko na oznaczanie stężenia AAT, ale dają możliwość badania poszczególnych wariantów tego inhibitora.

Podstawowym celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych metod diagnozowania AATD i zapoznanie się z aktualnymi problemami związanymi z oznaczaniem wariantów AAT. Identyfikację genotypu i fenotypu alfa-1-antytrypsyny u osób z chorobami płuc i wątroby stosuje się na świecie od dawna, natomiast w Polsce wykonują ją, głównie do celów naukowych, tylko nieliczne laboratoria. Większe zainteresowanie tym problemem mogłoby ułatwić wprowadzenie przedstawionych niżej metod do rutynowego wykorzystania w laboratoriach diagnostycznych w Polsce.

Funkcja biologiczna alfa-1-antytrypsyny

Alfa-1-antytrypsyna, zwana także alfa-1-antyproteazą, jest glikoproteiną o masie molekularnej 55 kDa zbudowaną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (394 aminokwasy) oraz trzech łańcuchów oligosacharydowych [6]. Białko to jest syntetyzowane głównie w wątrobie, a następnie wydzielane do krwiobiegu [7]. Alfa-1-antytrypsyna należy do rodziny serpin i jest jednym z najważniejszych osoczowych i tkankowych inhibitorów proteaz serynowych w organizmie człowieka. Skutecznie hamuje działanie wielu enzymów, między innymi: proteinazy 3, katepsyny G, trypsyny oraz elastazy neutrofilowej, wobec której inhibitor wykazuje najwyższą aktywność [8].

Opierając się na licznych badaniach, wskazano na istotny udział alfa-1-antytrypsyny w zachowaniu równowagi proteazowo-antyproteazowej w warunkach *in vivo*. Inhibitor ten stanowi niezwykle ważny element osłony antyelastazowej w płucach, zabezpieczającej tkankę łączną tego narządu przed niekontrolowanym, destrukcyjnym wpływem enzymów proteolitycznych. Dlatego też niskie stężenie tego białka w układzie oddechowym prowadzi do stopniowego i nieodwracalnego zmniejszania elastyczności płuc. Na skutek nadmiernej aktywności elastazy neutrofilowej dochodzi do degradacji elastyny, głównego składnika włókien sprężystych oraz innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej w dolnych drogach oddechowych [9].

Na podstawie badań epidemiologicznych przeprowadzonych w wielu krajach potwierdzono związek między niedoborem AAT a rozwojem przewlekłych chorób płuc. Alfa-1-antytrypsyna jest istotnym czynnikiem ryzyka powstania wczesnej rozedmy płuc (między 30. a 40. rż.), przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), przewlekłego zapalenia oskrzeli, rozstrzeni oskrzeli oraz astmy, szczególnie u palaczy [10]. Dym tytoniowy zawiera różnorodne substancje drażniące, powodujące napływ neutrofilów i makrofagów do płuc. Palenie papierosów nasila również stres oksydacyjny w układzie oddechowym, który inaktywuje i tak już niskie ilości alfa-1-antytrypsyny [11]. Palacze z poważnym niedoborem tego inhibitora umierają przeważnie 20 lat wcześniej niż osoby niepalące z podobnym deficytem [12].

Do innych manifestacji klinicznych AATD występujących głównie w dzieciństwie należą choroby wątroby, takie jak zapalenie, marskość i rak wątroby [10]. Zaburzenia te spowodowane są akumulacją zmutowanych cząsteczek AAT w hepatocytach [13].

Molekularne podłoże niedoboru alfa-1-antytrypsyny

Niedobór alfa-1-antytrypsyny jest genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem spowodowanym defektem w genie *SERPINA1* (wcześniej określanym jako PI), zlokalizowanym na długim ramieniu chromosomu 14 w pozycji q13-q13.2. Ludzki gen AAT został sklonowany i opisany w 1984 roku. Zajmuje obszar około 10,2 kb i składa się z 7 eksonów i 6 intronów. Pierwsze trzy eksony (I_A-I_C) kodują nieulegające translacji mRNA, podczas gdy tylko cztery ostatnie eksony (II-V) zawierają informację dotyczącą struktury białka AAT [14]. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 130 odmian genetycznych tego inhibitora, które wiążą się ściśle z określonym stężeniem alfa-1-antytrypsyny w surowicy i jego funkcją [15]. Warianty AAT sklasyfikowano w układzie określanym jako systemem PI (PI, *protease inhibitor*) [1]. Klasyfikacja ta powstała na podstawie techniki ogniskowania izoelektrycznego (IEF, *isoelectrofocusing*) — metody polegającej na rozdziale białek w żelach poliakrylamidowych w gradiencie pH. Różnice w szybkości migracji poszczególnych wariantów wykorzystuje się do identyfikacji fenotypu AAT. Szybko migrujące warianty AAT oznaczono początkowymi literami alfabetu, zaś te rozdzielające się wolniej — dalszymi [16]. System PI zawiera także odmiany genetyczne AAT, wykrywane molekularnymi metodami analizy DNA.

Dla celów klinicznych i praktycznych wprowadzono podział wariantów AAT na 4 klasy, w zależności od stężenia i funkcji danego typu w osoczu [17]. Rodzina prawidłowych odmian alfa-1-antytrypsyny określana jest jako PIM (średnia migracja). Są to najczęściej występujące allele genu AAT w populacji kaukaskiej (obecne u około 95% przypadków), zapewniające prawidłowe stężenie i prawidłową funkcją tego inhibitora w osoczu [17]. Wyróżnia się kilka podtypów tego podstawowego wariantu. W populacji polskiej dominują głównie homozygoty PIM1M1 (około 55% wszystkich fenotypów) oraz heterozygoty: PIM1M2 i PIM1M3 (25% i 5–10%) [18].

Kolejną klasę stanowią warianty deficytowe, których białkowe produkty ulegają wewnątrzkomórkowej akumulacji lub degradacji w wątrobie, prowadząc do znacznego spadku AAT w krwiobiegu. W grupie tej znajdują się dwa najczęściej występujące u chorych z niedoborem alfa-1-antytrypsyny allele — Z i S [17].

U podstaw wariantu Z (bardzo wolna migracja) leży pojedyncza mutacja punktowa prowadząca do podstawienia lizyny na kwas glutaminowy w kodonie 342 [19]. Mutacja Z powoduje utratę prawidłowej konformacji przestrzennej inhibitora, efektem czego jest polimeryzacja nowo syntetyzowanych cząsteczek AAT i powstawanie inkluzji wewnątrz hepatocytów [20]. Wykazano również, że zmutowane formy AAT, które opuszczają wątrobę, charakteryzują się obniżoną aktywnością inhibicyjną [21]. U chorych z genotypem PIZZ stężenie alfa-1-antytrypsyny w surowicy wynosi 10–15% prawidłowego stężenia [22] (tab. 1). Genotyp ten stwierdza się w blisko 95% analizowanych przypadków u osób z rozpoznanym klinicznie niedoborem AAT, zazwyczaj z najcięższymi postaciami choroby [23].

Tabela 1. Stężenie alfa-1-antytrypsyny w surowicy [23]

Table 1. Serum levels of alpha-1-antitrypsin [23]

Fenotyp	Częstość (%)	[mg/dl] (μM)
MM	90	150–350 (20–48)
MZ	4	90–210 (17–33)
SS	1,5	100–200 (15–33)
SZ	0,2	75–120 (8–16)
ZZ	0,02	20–45 (2,5–7)
Null-Null	Bardzo rzadkie	0

*Szacowana dla populacji Europy Północnej

Produkt białkowy allelu S (wolna migracja) w porównaniu z produktem białkowym najczęstszego allelu M różni się podstawieniem kwasu glutaminowego na walinę w pozycji 264 [24]. Ta pojedyncza zmiana aminokwasu w kodowanym białku prowadzi do wewnątrzkomórkowej degradacji inhibitora. Homozygoty PISS charakteryzują się stężeniem AAT w surowicy ~40% niższym niż osoby z prawidłowym genotypem PIMM [17]. Należy zaznaczyć, że w większości przypadków obniżone stężenie AAT obserwowane u osób z wariantem PISS, PIMZ czy PIMS zapewnia wystarczającą obronę przeciw enzymom proteolitycznym i zapobiega wystąpieniu manifestacji klinicznych tego niedoboru. Jednak niektóre osoby z PIMZ, PIMS, PISS, PISZ, szczególnie palacze, u których stężenie AAT w surowicy spada poniżej 40% prawidłowego, charakteryzuje podwyższone ryzyko rozwoju chorób układu oddechowego [17].

Kolejną klasę stanowią allele zerowe tzw. *null* (PIQO). Są to rzadkie warianty genetyczne alfa-1-antytrypsyny, których produktów białkowych nie wykrywa się w krwiobiegu. Przyczyną tego zjawiska są mutacje prowadzące między innymi do nieprawidłowego składania genu (*splicing*), przedwczesnego zatrzymania translacji, wypadnięcia części regionów kodujących genu lub wewnątrzkomórkowej degradacji białka [25].

Ostatnią klasę tworzą odmiany genetyczne AAT, które kodują dysfunkcyjne białka. Przykładem może być allel Pittsburgh. Białko AAT z mutacją Pittsburgh wykazuje podobną aktywność katalityczną jak antytrombina III i jest silnym inhibitorem osoczowej kalikreiny oraz aktywowanego czynnika XI [26].

Diagnostyka niedoboru alfa-1-antytrypsyny

Pomiar stężenia

Pełna diagnostyka niedoboru AAT oparta jest na kombinacji analiz ilościowych i jakościowych. Badaniem wstępnym wykonywanym u osób z podejrzeniem deficytu tego inhibitora jest pomiar stężenia alfa-1-antytrypsyny w surowicy/osoczu krwi przy użyciu metod immunologicznych lub kolorymetrycznych. Najczęściej stosowane są: immunoelektroforeza rakietkowa, immunodyfuzja radialna, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) oraz nefelometria [17]. Stężenie AAT może być wyrażane w miligramach na decylitr (mg/dl) lub w mikromolach na litr (μmol/l lub μM). Prawidłowe wartości stężenia AAT w surowicy osób zdrowych mierzone za pomocą immunoelektroforezy rakietkowej wynoszą 150–330 mg/dl, zaś dla metody neflometrycznej 83–220 mg/dl [27, 28]. Na podstawie badań prowadzonych wśród nosicieli wariantów deficytowych przypuszcza się, że w surowicy istnieje pewne stężenie graniczne AAT, powyżej którego tkanki chronione są przed degradacyjnym wpływem enzymów proteolitycznych [29]. Przyjmuje się, że próg ten wynosi 11 μmol/l, odpowiednio 80 mg/dl dla immunoelektroforezy rakietowej, oraz 50 mg/dl dla metody nefelometrycznej [17].

Stwierdzenie nieprawidłowego stężenia AAT u osoby badanej (poniżej stężenia progowego), powinno stanowić podstawę do dalszych badań jakościowych. Należy jednak podkreślić, że uzyskanie prawidłowego wyniku badania stężenia AAT nie zawsze odzwierciedla stan równowagi proteazowo-antyproteazowej w organizmie. Alfa-1-antytrypsyna należy do grupy białek ostrej fazy, których stężenie wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek, infekcje oraz innego rodzaju stymulatory odpowiedzi zapalnej [30]. Procesy te podwyższają stężenie krążącej AAT, maskując jego rzeczywisty deficyt.

Również osoby z niskim prawidłowym stężeniem AAT (12–35 μM lub 90–140 mg/dl) powinny być poddane dalszym badaniom. Fakt zachodzenia na siebie wartości stężenia białka w surowicy/osoczu osób zdrowych i nosicieli wariantów deficytowych (heterozygoty) może bowiem powodować pomijanie genotypów PISZ, PISS, PIMZ w diagnozie [17].

Według wspólnych zaleceń *American Thoracic Society* (ATS) *i European Respiratory Society* (ERS) z 2003 roku [17] ilościowa analiza AAT krążącej we krwi powinna być przeprowadzona u wszystkich osób:

1. Z nieobecną frakcją alfa-1-globuliny w elektroforetycznym rozdziale białek surowicy;
2. Z wczesną postacią rozedmy płuc;
3. U członków rodziny chorego z niedoborem AAT;
4. Z dusznością lub przewlekłym kaszlem występującymi przynajmniej u 3 bliskich krewnych;
5. Z chorobami wątroby o nieznanej etiologii;
6. Z POChP;
7. Z astmą, u których terapia nie przynosi poprawy.

Rozpoznanie

Tak jak w przypadku wielu innych chorób dziedzicznych, zarówno pełna weryfikacja rozpoznania klinicznego AATD, jak i potwierdzenie wyniku oznaczenia ilościowego możliwe są tylko na poziomie molekularnym. W przypadku niedoboru AAT taką weryfikację zapewnia jedynie identyfikacja fenotypu lub genotypu inhibitora. Powszechnie wykorzystywaną metodą identyfikacji wariantów AAT jest wspomniana wcześniej technika ogniskowania izoelektrycznego, która umożliwia określenie typu krążącego białka AAT (fenotyp). Alternatywą dla tej techniki jest analiza DNA. Badania genetyczne pozwalają bezpośrednio wykazać obecność mutacji w *locus* PI odpowiedzialnej za powstanie niedoboru.

Fenotypowanie

Od ponad 30 lat ogniskowanie izoelektryczne uważa się za „złoty standard" w diagnostyce niedoboru alfa-1-antytrypsyny. Niewielkie zmiany fizykochemiczne inhibitora pozwalają na różnicowanie wariantów AAT drogą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w gradiencie pH 4,2 do 4,9 [31, 32]. Białko jako wielocząsteczkowy związek amfoteryczny obdarzone jest ładunkiem elektrycznym. Jego wartość stanowi wypadkową wszystkich ładunków, jakie posiadają dysocjujące grupy aminokwasów budujących łańcuch polipeptydowy. Dla każdego białka można podać określoną wartość pH, przy której ładunek sumaryczny ma wartość zero. Takie pH nazywa się punktem izoelektrycznym (pI).

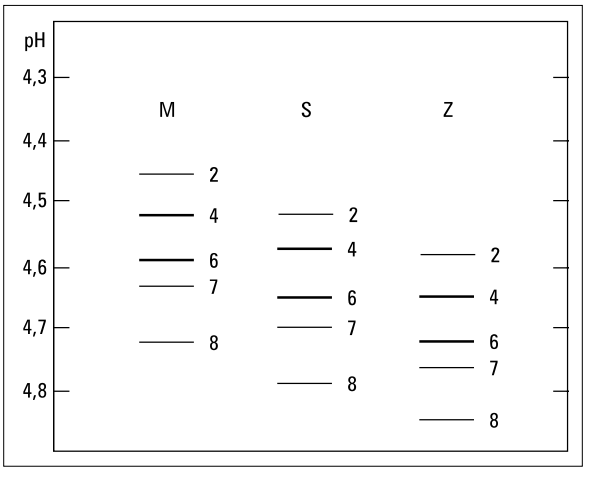
Ogniskowanie izoelektryczne jest techniką, która pozwala na rozdział molekuł białkowych zgodnie z ich wartościami pI. IEF odbywa się w żelu o ustalonym gradiencie pH, którego otrzymanie jest możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych nośników zwanych amfolinami. Kierunek

i prędkość wędrówki cząsteczek białka podczas elektroforezy jest uwarunkowana wielkością ładunku elektrycznego molekuły w momencie startu, wartością pI, a także w pewnym stopniu rozmiarem cząsteczki. Białka zatrzymują swoją wędrówkę w polu elektrycznym w takim punkcie żelu, w którym pH odpowiada punktowi izoelektrycznemu. Obojętna elektrycznie makrocząsteczka nie doznaje wówczas działania sił pola elektrycznego.

Fenotyp inhibitora proteaz serynowych może być określany w próbkach osocza, surowicy, ale także w plamach krwi. W obrazie elektroforetycznym wszystkich homozygotycznych typów AAT obserwuje się występowanie przynajmniej 5 widocznych pasm, których punkty izoelektryczne mieszczą się w zakresie 4,2–4,9 [16]. Właściwości te wykorzystano dla różnicowania odmian genetycznych inhibitora proteaz i stworzenia systemu PI. Zmienna zawartość reszt kwasu sjalowego w węglowodanowej części łańcucha cząsteczki glikoproteiny jest jedną z głównych przyczyn mikroheterogenności AAT. Dwa główne pasma (oznaczone M_4 i M_6), zawierające największą ilość białka, różnią się od siebie zawartością 1 mola kwasu sjalowego [33]. Analiza prążkowa tych pasm umożliwia określenie podtypów podstawowego wariantu PIM [16].

Glikoformy znajdujące się w pasmach M_7 i M_8 mają identyczną strukturę węglowodanową jak M_4 i M_6, jednakże ich łańcuch peptydowowy pozbawiony jest 5 N-końcowych aminokwasów (Glu-Asp-Pro-Gln-Gly). Utrata tego pentapeptydu (mająca charakter potranslacyjnej modyfikacji białka), a szczególnie dwóch ujemnie naładowanych aminokwasów (kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego) odpowiedzialna jest za „katodową" pozycję tych pasm w stosunku do pasm głównych [34]. W przypadku wariantów M, Z, S, jak i innych wariantów genetycznych różnica ładunku elektrycznego między tymi białkami zależy od podstawnika aminokwasowego. Zmiany w składzie aminokwasowym łańcucha polipeptydowego sprawiają, że odmiany PIZ i PIS ogniskują bliżej katody (ryc. 1).

Występowanie nietypowego pasma w obrazie elektroforetycznym rozdziału AAT wymaga potwierdzenia jego swoistości. Najprostszym rozwiązaniem jest immunofiksacja, czyli precypitacja pasma białkowych swoistą dla AAT surowicą [33]. Często też wykonuje się transfer elektroforetyczny, polegający na przeniesieniu i trwałym związaniu rozdzielonego w procesie elektroforezy materiału ze stałym podłożem (filtry nitrocelulozowe). Utrwalone na podłożu stałym izoformy AAT są wykrywane immunochemicznie przez przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej alfa-1-antytrypsynie [35].



Rycina 1. Schemat rozdziału elektroforetycznego głównych wariantów fenotypowych alfa-1-antytrypsyny metodą ogniskowania izoelektrycznego w zakresie pH 4–5 (opis w tekście) [31, 33]

Figure 1. Schematic arrangement of AAT bands in the major phenotypic variants after isoelectrofocusing at ph 4–5 range (description in text) [31, 33]

Ogniskowanie izoelektryczne umożliwia identyfikację prawie wszystkich wariantów alfa-1-antytrypsyny, zarówno tych rzadkich, jak i najczęstszych występujących w układzie homo- i heterozygotycznym. Jednak mimo tych zalet, metoda ta jest dość trudna technicznie i bardzo czasochłonna. Ze względu na złożoną mikroheterogenność oraz znaczną liczbę wariantów AAT wymaga dużego doświadczenia i umiejętności analizy wyników [36]. Dodatkową wadą fenotypowania jest fakt, że nie rozpoznaje wariantów niemych AAT. Istnieją także rzadkie odmiany inhibitora proteaz serynowych o identycznej lub nieznacznie różnej wartości punktu izoelektrycznego. Prawidłowa interpretacja wyników elektroforezy tych fenotypów sprawia bardzo duże trudności i wymaga ogromnej liczby standardów, tymczasem odpowiednie kontrole do IEF nie są komercyjnie dostępne. Zazwyczaj problem stanowi także odróżnienie fenotypów PISZ i PIZZ. Pasma S6 i Z4 mają tę samą wartość pI, a więc w warunkach elektroforezy nakładają się na siebie. Kluczowym faktem jest więc różnica w intensywności zabarwienia frakcji Z_6 i Z_4. We wzorze elektroforetycznym fenotypu PISZ pasmo Z_6 jest jaśniejsze [33]. W niektórych przypadkach dla rozpoznania fenotypu konieczne są pogłębione badania rodzinne.

Należy także zaznaczyć, że IEF może generować fałszywe wyniki. U chorych leczonych terapią substytucyjną metoda ta wykrywa zarówno natywne warianty inhibitora, jak i białko terapeutyczne [37]. Ponadto, próbki do identyfikacji feno-

typu AAT metodą IEF powinny być bardzo dobrej jakości, gdyż tylko takie zapewniają możliwość prawidłowego rozpoznania fenotypu [38].

Do różnicowania wariantów fenotypowych inhibitora proteaz można stosować także inne techniki elektroforetyczne, między innymi elektroforezę w kwaśnym żelu skrobiowym [39], w żelu agarozowym [40] czy też kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (CIEF, *capillary isoelectric focusing*) [41].

Test ELISA

Test ELISA jest jednym z najpowszechniej stosowanych testów immunoenzymatycznych w badaniach biomedycznych. Służy on do wykrywania określonych białek przy użyciu specyficznych przeciwciał lub antygenów sprzężonych z odpowiednim enzymem. Większość z tych enzymów wytwarza barwne produkty, które mogą być łatwo monitorowane głównie z wykorzystaniem technik kolorymetrycznych. Obecnie dostępny jest tylko jeden gotowy zestaw odczynników do diagnostyki niedoboru AAT firmy Wieslab. Jest to zestaw do jakościowego oznaczenia wariantów PIZ w surowicy. *Wieslab AAT Deficiency Test* wykorzystuje specyficzne przeciwciała monoklonalne AZT11 rozpoznające epitop znajdujący się tylko na spolimeryzowanych formach alfa-1-antytrypsyny [42]. Zaletami tego testu są bardzo wysoka, bo aż 100% czułość i specyficzność w detekcji wariantu PIZ. Badania porównawcze przeprowadzone na łącznej grupie 264 osób wykazały całkowitą zgodność wyników uzyskiwanych przy pomocy powyższego zestawu z rezultatami IEF [42]. Prostota wykonania, możliwość oznaczania AAT bezpośrednio w materiale biologicznym (tj. bez kłopotliwego etapu izolacji) oraz stosunkowo krótki czas potrzebny do wykonania oznaczenia dużej liczby prób sprawia, że *Wieslab AAT Deficiency Test* może być stosowany w badaniach przesiewowych. Należy jednak zaznaczyć, że zestaw ten pozwala na identyfikację jedynie najczęściej występującego wariantu PIZ. Ponadto uzyskanie dodatniego wyniku nie dostarcza informacji, czy wariant ten występuje w układzie homo-, czy heterozygotycznym.

Genotypowanie

Poznanie podłoża molekularnego niedoboru alfa-1-antytrypsyny przyczyniło się do opracowania wielu testów genetycznych służących rozpoznaniu tego zaburzenia. Większość z tych metod polega na bezpośredniej identyfikacji nieprawidłowości w obrębie genu AAT odpowiedzialnej za powstanie deficytu i umożliwia rozpoznanie nosicielstwa mutacji niemal ze 100% pewnością. W rutynowo wykonywanej diagnostyce molekularnej AATD bada się obecność dwóch najczęściej występujących mutacji — Z i S.

Podstawą większości metod identyfikacji mutacji jest analiza powielanego w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) odpowiedniego regionu DNA. Reakcja PCR jest metodą wyjściową dla większości badań i pozwala przy użyciu enzymu — termostabilnej polimerazy — na zwielokrotnienie (amplifikację) interesującego nas fragmentu genu przed dalszą analizą. Namnożeniu ulega odcinek DNA położony między parą starterów (primerów). Są to krótkie, jednoniciowe fragmentu DNA komplementarne do jednego z końców 5' powielanego regionu DNA. Reakcja PCR składa się z trzech cyklicznie powtarzających się etapów (denaturacja matrycy DNA, przyłączanie starterów, wydłużanie nici DNA) i jest przeprowadzana w urządzeniu zwanym termocyklerem (blok grzejny). Po 30 cyklach wyjściowa ilość powielanego materiału genetycznego wzrasta niemal milion razy.

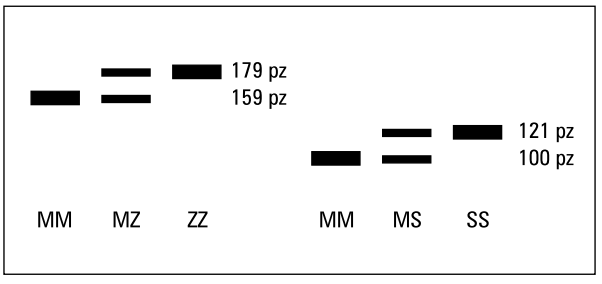
Podstawowym materiałem pobieranym od pacjenta w celu wykonania analizy genetycznej jest DNA genomowe izolowane z leukocytów krwi obwodowej. Alternatywnym źródłem DNA mogą być komórki innej dowolnej tkanki, na przykład komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej [43], a także próbka krwi na bibule [44, 45] i surowica (wolne DNA) [46]. W badaniach prenatalnych AATD materiał genetyczny dziecka izolowany jest z amniocytów — komórek płynu owodniowego [47].

Należy pamiętać, by nie wykonywać analizy molekularnej próbek krwi do 3 miesięcy po wykonaniu jej ewentualnego przetoczenia.

PCR-RFLP

Jedną z głównych technik biologii molekularnej wykorzystywanych do rozróżnienia alleli genów polimorficznych jest analiza restrykcyjna produktu PCR (PCR-RFLP, *restriction fragment-length polymorphism* PCR). W metodzie tej stosuje się enzymy restrykcyjne (określane jako endonukleazy restrykcyjne, restryktazy), które rozpoznają specyficzne sekwencje w DNA i przecinają dwuniciowe cząsteczki kwasu nukleinowego w ściśle określonym miejscu, zwanym miejscem restrykcyjnym. PCR-RFLP jest techniką wykorzystywaną do identyfikacji znanych mutacji punktowych, insercji czy małych delecji, które mogą powodować powstanie lub zanik miejsc restrykcyjnych.

W przypadku najczęstszego allelu deficytowego Z zamiana jednego nukleotydu (guaniny na ade-



Rycina 2. Oczekiwany wynik genotypowania dla mutacji Z i S
Figure 2. Expected result of genotyping for Z and S mutations

ninę — G1024A) nie jest rozpoznawana przez dostępne enzymy restrykcyjne. W celu jego wykrycia Tazelaar i wsp. użyli zmodyfikowanego primera (*mismatch primer*) wiążącego się w pobliżu miejsca występowania mutacji [48]. Starter ten wprowadza miejsce restrykcyjne dla enzymu *TaqI* i umożliwia rozróżnienie allelu zmutowanego od allelu „dzikiego". Restryktaza *TaqI* tnie produkt reakcji PCR (fragment eksonu III) jedynie w przypadku, gdy mutacja Z nie występuje. Wyniki trawienia ocenia się, rozdzielając elektroforetycznie powstałe fragmenty DNA w żelu agarozowym lub żelu poliakrylamidowym. Otrzymanie fragmentu o wielkości 157 pz świadczy o obecności allelu M, zaś fragmentu o wielkości 179 pz allelu Z. Do wykrywania wariantu S Tazelaar i wsp. zastosowali podobną metodykę jak w przypadku mutacji Z [48]. Przykładowy wynik genotypowania przedstawiono na rycinie 2.

Lucotte i Sesboe opracowali modyfikację powyższej metody, polegającej na równoczesnej amplifikacji fragmentów DNA obejmujących występowanie mutacji Z i S przy zastosowaniu tych samych par starterów jak w pracy Tazelaar i wsp. [48] w multipleksowej reakcji PCR [49]. Umożliwiło to jednoczesną identyfikację wariantów M, S i Z alfa-1-antytrypsyny w jednej rekcji łańcuchowej polimerazy (w jednej mieszaninie reakcyjnej). Reakcja multipleksowa oszczędza czas i odczynniki oraz sprawia, że w pojedynczym eksperymencie możliwe jest analizowanie większej liczby prób.

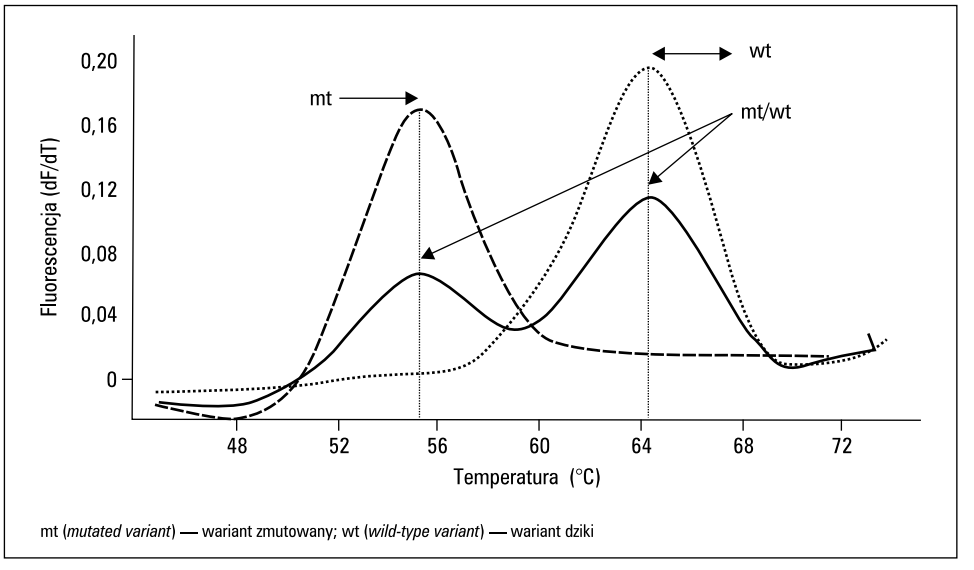
Innym przykładem multipleksowej reakcji PCR jest metoda opisana przez Riegera i wsp. [50]. Pozwala ona na wykrycie aż pięciu różnych wariantów genetycznych inhibitora proteaz serynowych takich jak Z, S, M2, M1(ala), i M1(val). Do ich określenia stosuje się analizę restrykcyjną z wykorzystaniem dwóch endonukleaz restrykcyjnych *Bst*EII i *Rsa*I. Z kolei w innej opublikowanej niedawno pracy [51] przedstawiono metodę identyfikacji alleli: Z, S, M1(ala), M1(val) przy zastosowaniu restryktaz *Sex*AI/*Hpy*99I.

PCR-RFLP jest techniką znacznie prostszą, wydajniejszą i mniej pracochłonną niż metoda ogniskowania izoelektrycznego, jednakże ograniczoną tylko do najczęstszych mutacji genu AAT. Metoda ta wymaga wiedzy na temat techniki PCR oraz używania kontroli dodatnich (znanych genotypów) i negatywnych (odczynnikowa).

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) to czuła i precyzyjna technika wykorzystywana do ilościowej i jakościowej analizy kwasów nukleinowych. Metoda ta bazuje na konwencjonalnej technice PCR, w której ilość amplifikowanego produktu, wyznakowanego fluorescencyjnie, jest mierzona w czasie rzeczywistym przez specjalne systemy detekcyjne w każdym cyklu reakcji. Monitorowanie przyrostu liczby kopii badanej sekwencji jest możliwe dzięki zastosowaniu znakowanych starterów lub sond oligonukleotydowych komplementarnych do powielanego fragmentu DNA. Wykorzystuje się również specjalne barwniki, które po związaniu się z dwuniciowym DNA emitują światło o określonej długości fali. *Real-time PCR* wymaga specjalnie przystosowanego do tego celu termocyklera, umożliwiającego pomiar fluorescencji w trakcie trwania reakcji. Ilość emitowanej fluorescencji jest proporcjonalna do ilości powstającego produktu w każdym cyklu PCR.

Technika *real-time PCR* to nie tylko ilościowa, ale także jakościowa metoda służąca do rozróżniania alleli genów polimorficznych. Metodę tą zastosowano w analizie molekularnej AATD po raz pierwszy pod koniec ubiegłego wieku do wykrywania dwóch najczęstszych mutacji Z i S [52]. Wykorzystywano również sondy hybrydyzujące (typu LightCycler) komplementarne dla wariantu typu dzikiego lub zmutowanego [52–54], które pozwalają na wyznaczenie krzywej topnienia amplifikowanego produktu i określenie temperatury dysocjacji dupleksu sonda–matryca (temperatury topnienia, Tm). Na podstawie krzywej topnienia identyfikuje się występowanie homozygot allelu dzikiego i zmutowanego oraz heterozygot (ryc. 3). Jest to możliwe dzięki temu, że sondy po związaniu z sekwencją, w której występują zmiany, wykazują fluorescencję, a Tm tego dupleksu jest niższa (ze względu na zmniejszenie stabilności dupleksu sonda–matryca) niż Tm dupleksu w pełni komplementarnego. W efekcie zmiana temperatury topnienia informuje o mutacjach w badanym materiale genetycznym. Należy jednak zaznaczyć, że wystąpienie w obrębie miejsca (sekwencji) wią-



Rycina 3. Przykładowy wynik analizy krzywej topnienia

Figure 3. Exemplary results of melting curve analysis

zania sondy zmiany nukleotydowej innej niż oczekiwana może utrudnić prawidłowe rozróżnienie allelu deficytowego od innego wariantu genetycznego. Dopiero użycie dwóch różnie wyznakowanych sond hybrydyzujących przez Von Ahsena i wsp. w multipleksowej reakcji *Real-time PCR* pozwoliło na identyfikacje mutacji Z i S w jednej mieszaninie reakcyjnej [53].

Ostatnio Kaczor i wsp. wykorzystali sondy degradujące (typu TaqMan) w analizie genetycznych AATD [55]. Sondy typu TaqMan nie umożliwiają wyznaczenia krzywej topnienia, jednak dzięki wyższej specyficzności hybrydyzacji pozwalają na lepszą dyskryminację matrycy, przez co sygnał fluorescencji uwalniany jest tylko wtedy, gdy sonda zwiąże się ze specyficzną sekwencją (między miejscami wiązania starterów), która w sposób wykładniczy powielana jest podczas reakcji PCR. Kaczor i wsp. zastosowali sondy komplementarne dla wariantu typu dzikiego i zmutowanego (mutacja Z i S) sprzężonych z dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi ROX i FAM. Emisja światła fluorescencyjnego przez znacznik ROX świadczy o występowaniu w badanym materiale genetycznym sekwencji dzikiej, zaś wzrost fluorescencji dla znacznika FAM informuje o obecność mutacji. Orru i wsp. także zastosowali nowy typ sond molekularnych (*molecular beacons*) do wykrywania podtypów podstawowego wariantu M [56].

Technika *Real-time PCR* jest potężnym narzędziem analitycznym w badaniach genetycznych. Dzięki swej powtarzalności, dokładności, specyficzności oraz krótkiemu, nieprzekraczającemu dwóch godzin czasowi analizy sprawia, że identyfikacja mutacji Z i S przy użyciu technik ilościowego PCR w czasie rzeczywistym może z powodzeniem być stosowana w rutynowej diagnostyce niedoboru alfa-1-antytrypsyny, a także w badaniach przesiewowych.

Ograniczenia tej metody są takie same jak w przypadku wymienionej wcześniej analizy PCR-RFLP. Dodatkowo, ze względu na możliwość kontaminacji badanej próby nawet znikomą ilością obcego materiału genetycznego i bardzo wysoką czułość techniki, wzrasta ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich. W celu zabezpieczenia przed kontaminacją konieczne są więc odpowiednia organizacja pracy i rygorystyczne przestrzeganie szczególnych zabezpieczeń w trakcie wykonywania czynności badawczych. Istotną wadą tej metody jest też wysoki koszt aparatury i odczynników.

Przesiewowa technika wykrywania mutacji

Elektroforeza w gradiencie denaturującym (DGGE, *denaturating gradient gel electrophoresis*) to znana technika wstępnego wykrywania zmian w materiale genetycznym. Metoda oparta jest na zależnej od budowy (składu zasad i długości) zdolności denaturacji (rozdzieleniu na pojedyncze nici) produktów reakcji PCR w różnych temperaturach i stężeniach substancji denaturującej. W trakcie rozdziału elektroforetycznego prowadzonego w żelu o wzrastającym stężeniu związku denaturującego (formamid, mocznik) dwuniciowe fragmenty DNA zawierające mutację ulegają denaturacji przy innym stężeniu czynnika denaturującego niż

fragmenty prawidłowe. Rozdział na pojedyncze nici powoduje gwałtowne zmniejszenie szybkości migracji cząsteczek DNA. Dlatego też odmienna migracja w żelu jednego z fragmentów DNA pacjenta w porównaniu z analogicznymi fragmentami osób z grupy kontrolnej wskazuje na obecność mutacji lub na polimorfizm badanego regionu.

Zastosowanie techniki DGGE do identyfikacji mutacji w AATD było przedmiotem kilku publikacji [57–59]. Analizie poddaje się cały region kodujący genu AAT (eksony II-V włącznie z miejscami splicingowymi), który podzielony jest na siedem amplikonów [58, 59]. Powielone fragmenty rozdziela się w 6,5% żelu poliakrylamidowym z gradientem czynnika denaturującego od 20% do 70% przez 6 godz. w 240 V [59].

Na podstawie badania porównawczego wykazano, że DGGE jest metodą czulszą w wykrywaniu wariantów alfa-1-antytrypsyny (genotypu) niż ogniskowanie izoelektryczne [57]. Metoda ta w porównaniu z omawianymi wcześniej technikami genotypowania daje możliwość identyfikacji nie tylko tych najczęstszych i znanych wariantów, ale również rzadkich i zupełnie nowych. Dzięki swej wysokiej czułości oraz niezawodności DGGE jest jedną z najbardziej wydajnych metod przesiewowych, szczególnie przydatnej w analizie genów, w których mutacje są liczne i losowo położone, takich jak AAT. Należy jednak zaznaczyć, że technika ta jest czasochłonna, kosztowna i nie pozwala na pełne scharakteryzowanie mutacji. Metody przesiewowe określają tylko, w jakim regionie genu występuje zmiana w sekwencji nukleotydowej. Pełnej charakterystyki tego fragmentu DNA dostarcza jedynie sekwencjonowanie, które jest najdokładniejszą metodą analizy kwasów nukleinowych.

Do innych metod przesiewowych stosowanych w ATTD zalicza się analizę polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP, *single strand conformation polimorphism*). Ortiz-Pallardo i wsp., stosując metodę SSCP, wykazali możliwość ujawniania mutacji Z w materiale genetycznym izolowanym z wycinków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w bloczkach parafinowych [60].

Analiza sekwencyjna

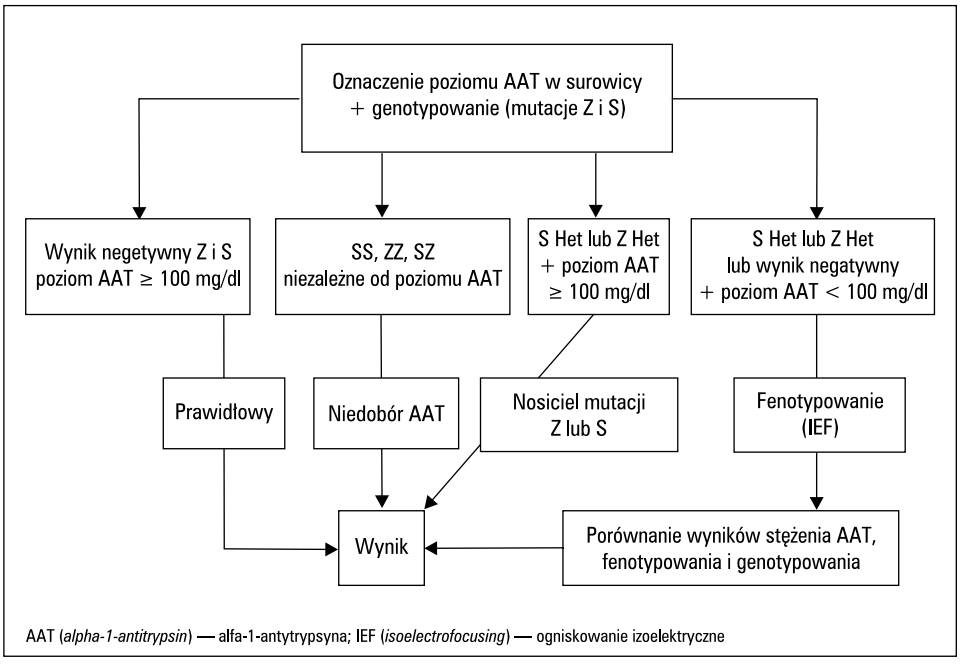
Sekwencjonowanie pozwala na ustalenie sekwencji, czyli określenie kolejności ułożenia par nukleotydowych w analizowanym fragmencie DNA. Najczęściej wykorzystuje się metodę enzymatyczną Sangera, polegającą na przedwczesnej terminacji wydłużania nowych komplementarnych nici polideoksyrybonukleotydowych, syntetyzowanych na matrycy sekwencjonowanego DNA, przez przypadkowe włączenie przez polimerazę DNA dideoksynukleotydów wyznakowanych fluorescencyjnie. Dzięki zastosowaniu czterech różnych znaczników fluorescencyjnych otrzymuje się mieszaninę fragmentów DNA o różnej długości zakończonych specyficznie znakowanym nukleotydem. Elektroforetyczny rozdział fragmentów umożliwia ich segregację pod względem wielkości, zaś analiza fluorescencji emitowanej przez znacznik pozwala na określenie, jaki nukleotyd został włączony ostatni. Elektroforeza oraz detekcja fluorescencji przeprowadzane są automatycznie, a wyniki opracowywane komputerowo.

Sekwencjonowanie wykrywa wszelkie zmiany w sekwencji nukleotydów badanego regionu DNA, dlatego też umożliwia rozpoznanie prawie wszystkich wariantów genetycznych alfa-1-antytrypsyny. Wymaga to jednak sekwencjonowania czterech eksonów (II-V) genu *SERPINA1* lub fragment genu wytypowanego w badaniu przesiewowym. Analiza sekwencyjna jest najbardziej informatywną metodą, ale przy tym niezwykle kosztowną i pracochłonną, wymagającą skomplikowanego sprzętu i doświadczonych pracowników. Technika ta nie jest rutynowo stosowana w diagnostyce AATD, a jedynie w przypadkach podejrzenia rzadkich lub nowych wariantów alfa-1-antytrypsyny (nietypowy wzór IEF, niskie stężenie AAT).

Model postępowania diagnostycznego

Aktualne stanowisko ATS i ERS dotyczące diagnozowania i postępowania z przypadkami niedoboru AAT zawiera zalecenie wykonywania analizy ilościowej białka krążącego we krwi między innymi u osób z przewlekłą niewydolnością oddechową [17]. Stwierdzenie nieprawidłowego (poniżej 11 μM) lub niskiego prawidłowego stężenia AAT u osoby badanej (12–35 μM, lub 90–140 mg/dl) wymaga przeprowadzenia dalszych badań jakościowych. W chwili obecnej „złotym standardem" i podstawą weryfikacji rozpoznania klinicznego pozostaje fenotypowanie AAT metodą IEF. Należy jednak podkreślić, że włączenie genotypowania w algorytm postępowania diagnostycznego w populacyjnych badaniach przesiewowych oraz w diagnozowanie osób z przewlekłą niewydolnością oddechową bądź asymptomatycznych nosicieli deficytowego wariantu znacząco ułatwia i przyspiesza rozpoznanie (ryc. 4).

Pod koniec 2006 roku Snyder i wsp. zaprezentowali nowy precyzyjny model postępowania diagnostycznego przy podejrzenia niedoboru AAT oparty na ilościowym pomiarze stężenia białka w surowicy skojarzonym z detekcją mutacji Z i S



Rycina 4. Algorytm postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu niedoboru AAT, zaproponowamy przez Bornhorsta i wsp. [15]. Immunoturbidymetryczny pomiar stężenia AAT w surowicy oraz analiza mutacji Z i S metodą *real-time PCR* są pierwszym etapem postępowania diagnostycznego. Identyfikacja osób z genotypem ZZ, SS lub SZ, niezależnie od oznaczonego poziomu AAT, pozwala na postawienie diagnozy bez konieczności dalszych badań. W przypadkach stwierdzenia jednej z mutacji Z lub S (S Het lub Z Het) oraz poziomu AAT < 100 mg/dl przeprowadza się badanie potwierdzające metodą fenotypowania IEF. Osoby z heterozygotycznym allelem Z lub S (S Het lub Z het), u których poziom AAT jest ≥ 100 mg/dl uznaje się za heterozygoty. Przypadki negatywne na obecność allelu S lub Z, przy poziomie AAT < 100 mg/dl, poddaje się fenotypowaniu IEF

Figure 4. The procedure algorithm of AAT deficiency diagnosis by Bornhorst et al. [15]. Immunoturbidimetric measurement of AAT serum concentration and real-time PCR analysis of Z and S mutations are the first step of diagnostic procedure. Identification of ZZ, SS and SZ genotypes, regardless of observed serum concentrations, enables to diagnosis report without further analysis. When a single S or Z allele is observed and the serum concentration is < 100 mg/dl the confirmatory IEF phenotyping is assayed. If heterozygous S or Z samples have a serum concentration of ≥100 mg/dl, the sample is reported as a likely S or Z heterozygote (Het). All samples exhibiting no S or Z allele and a concentration of < 100 mg/dl are also reflexively phenotyped

metodą PCR na wstępie każdego badania, co umożliwia prawidłowe oznaczenie genotypu u blisko 96% przypadków [38]. W ten sposób porównanie wyniku genotypowania z wynikiem analizy ilościowej pozwala na identyfikacje większości chorych z ATTD bez konieczności dalszych badań. W przypadku wystąpienia niezgodności między uzyskanym stężeniem AAT a wynikiem analizy genetycznej, czyli kiedy otrzymane stężenie AAT nie mieści się w zakresie stężeń przewidzianym dla oznaczonego genotypu, wykonuje się fenotypowanie metodą izoelektroogniskowania w celu ostatecznej weryfikacji rozpoznania klinicznego.

Ostatnio Bornhorst i wsp. zaproponowali podobny tok postępowania diagnostycznego w niedoborze AAT [15] (ryc. 4). W opracowaniu owego modelu diagnostycznego autorzy wykorzystali badania retrospektywne obejmujące ponad 50 000 prób. Algorytm ten cechuje się bardzo wysoką, bo przekraczającą 98% czułością w wykrywaniu AATD. Należy jednak zaznaczyć, że oba opisane modele nie sprawdzają się w identyfikacji nosicieli najrzadszych alleli warunkujących chorobę, pozwala jej bowiem postawić rozpoznanie tylko 1 na 10 takich przypadków. Za część nierozpoznanych prób (57%) odpowiada allel F, kodujący wadliwe białko o obniżonej aktywności inhibicyjnej. U osób z wariantem F obserwuje się prawidłowe stężenie AAT.

Powyższe modele diagnostyczne znacznie upraszczają i przyśpieszają diagnostykę niedoboru alfa-1-antytrypsyny. Tylko niewielki procent analizowanych przypadków wymaga wykonania fenotypowania (drogiego i czasochłonnego). Co więcej, pozwalają również na wykorzystanie do badań próbek krwi przesyłanych na bibule. W połączeniu z zaletami, jakie oferują testy bibułowe (próbka krwi na bibule), umożliwia to sprawne i efektywne prowadzenie badań screeningowych na szeroką skalę. Dobrym przykładem są ostatnio badania przesiewowe AATD przeprowadzone

w Niemczech, które pozwoliły na zidentyfikowanie 335 osób z ciężkim niedoborem alfa-1-antytrypsyny (8,2% przebadanych testów bibułowych) [61].

Niedobór alfa-1-antytrypsyny nie jest chorobą, ale zaburzeniem genetycznym, które w skojarzeniu z innymi uwarunkowaniami genetycznymi oraz czynnikami środowiskowymi może predysponować do rozwoju różnych jednostek chorobowych. Wprowadzenie rutynowych badań w kierunku AATD w Polsce pozwoli na wczesną diagnozę tego zaburzenia i pomoże uniknąć szeregu związanych z nim powikłań.

Piśmiennictwo

1. Luisetti M., Seersholm N. Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha-1-antitrypsin deficiency. Thorax 2004; 59: 164–169.
2. Blanco I., de Serres F.J., Fernandez-Bustillo E., Lara B., Miravitlles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of a1-antitrypsin deficiency in European countries Eur. Respir. J. 2006; 27: 77–84.
3. Kaczor M.P., Sanak M., Libura-Twardowska M., Szczeklik A. The prevalence of alpha-1-antitrypsin deficiency in a representative population sample from Poland. Respir. Med. 2007; 101: 2520–2525.
4. Brantly M. Efficient and accurate approaches to the laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: The promise of early diagnosis and intervention. Clin. Chem. 2006; 52: 2180–2181.
5. Stoller J.K., Sandhaus R.A., Turino G., Dickson R., Rodgers K., Strange C. Delay in diagnosis of α1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. Chest 2005; 128: 1989–1994.
6. Huber R., Carrell R.W. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. Biochemistry 1989; 28: 8951–8966.
7. Brantly M., Nukiwa T., Crystal R.G. Molecular basis of alpha-1--antitrypsin deficiency. Am. J. Med. 1988; 84: 13–31.
8. Travis J., Salvesen G.S. Human plasma proteinase inhibitors. Ann. Rev. Biochem. 1983; 52: 655–709.
9. Stockley R.A. Alpha-1-antitrypsin deficiency. What next? Thorax 2000; 55: 614–618.
10. Needham M., Stockley R.A. α_1-antitrypsin deficiency 3: Clinical manifestations and natural history. Thorax 2004; 59: 441––445.
11. Lomas D.A., Parfrey H. α_1-antitrypsin deficiency 4: Molecular pathophysiology. Thorax 2004; 365: 529–535.
12. Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha--1-antitrypsin deficiency, Pi Z. Acta Med. Scand. 1978; 204: 345–351.
13. Perlmutter D.H. Alpha-1-antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. Clin. Liver Dis. 2004; 8: 839–859.
14. Long G.L., Chandra T., Woo S.L., Davie E.W., Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. Biochemistry 1984; 23: 4828–4837.
15. Bornhorst J.A., Procter M., Meadows C., Ashwood E.R., Mao R. Evaluation of an integrative diagnostic algorithm for the identification of people at risk for alpha-1-antitrypsin deficiency. Am. J. Clin. Pathol. 2007; 128: 482–490.
16. Kowalska A., Rujner J. Diagnostyka niedoboru alfa-1-antytrypsyny metodą fenotypowania wariantów przy użyciu izoelektroogniskowania białek surowicy krwi w żelu agarozowym. Diagn. Lab. 1995; 31: 43–49.
17. 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.
18. Kowalska A., Rujner J. Polimorfizm locus PI (α-1-antytrypsyny) u mieszkańców województwa poznańskiego. Pol. Tyg. Lek. 1994; 49: 195–197.
19. Nukiwa T., Satoh K., Brantly M.L. i wsp. Identification of a second mutation in the protein–coding sequence of the Z type a1-antitrypsin gene. J. Biol. Chem. 1986; 261: 15 989–15 994.
20. Lomas D.A., Evans D.L., Finch J.T. i wsp. The mechanism of Z alpha-1-antitrypsin accumulation in the liver. Nature 1992; 357: 605–607.
21. Llewellyn-Jones C.G., Lomas D.A., Carrell R.W., Stockley R.A. The effect of the Z mutation on the ability of alpha 1-antitrypsin to prevent neutrophil mediated tissue damage. Biochem. Biophys. Acta 1994; 1227: 155–160.
22. Carrell R.W., Jeppsson J.O., Laurell C.B. i wsp. Structure and variation of human α1-antitrypsin. Nature 1982; 298: 329–334.
23. Stoller J.K., Aboussouan L.S. α1-antitrypsin deficiency. Lancet 2005; 365: 2225–2236.
24. Crystal R.G., Brantly M.L., Hubbard R.C., Curiel D.T., States D.J., Holmes M.D. The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy. Chest 1989; 95: 196–208.
25. Lee J.H., Brantly M. Molecular mechanisms of alpha-1-antitrypsin null alleles. Respir. Med. 2000; 94: S7–11.
26. Scott C.F., Carrell R.W., Glaser C.B., Kueppers F., Lewis J.H., Colman R.W. Alpha-1-antitrypsin-Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor XIa, kallikrein, and factor XIIf. J. Clin. Invest. 1986; 77: 631–634.
27. Brantly M.L., Wittes J.T., Vogelmeier C.F., Hubbard R.C., Fells G.A. 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: 703–708.
28. Walker M.B., Retzinger A.C., Retzinger G.S. A turbidimetric method for measuring the activity of trypsin and its inhibition. Anal. Biochem. 2006; 351: 114–121.
29. American Thoracic Society. Guidelines for the approach to the patient with severe hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency. Am. Rev. Respir. Dis. 1989; 140: 1494–1497.
30. Perlmutter D.H. Liver injury in α1-antitrypsin deficiency: an aggregated protein induces mitochondrial injury. J. Clin. Invest. 2002; 110: 1579–1583.
31. Jeppsson J.O., Franzén B. Typing of genetic variants of alpha 1-antitrypsin by electrofocusing. Clin. Chem. 1982; 28: 219–25.
32. Jeppsson J.O., Einarsson R. Genetic variants of alpha-1-antitrypsin and hemoglobin typed by isoelectric focusing in preselected narrow pH gradients with PhastSystem. Clin. Chem. 1992; 38: 577–580.
33. Piłacik B. Określenie fenotypów α1-antytrypsyny metodą ogniskowania izoelektrycznego. Diagn. Lab. 1989; 6: 276–283.
34. Jeppsson J.O., Lilja H., Johansson M. Isolation and characterization of 2 minor fractions of α_1-antitrypsin by high performance liquid chromatography chromatofocusing. J. Chromatogr. 1985; 327: 173–177.
35. Seyama K., Nukiwa T., Takabe K., Takahashi H., Miyake K., Kira S. Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha-1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. J. Biol. Chem. 1991; 266: 12 627–12 632.
36. Norman M.R., Mowat A.P. Hutchison D.C. Molecular basis, clinical consequences and diagnosis of alpha-l antitrypsin deficiency. Ann. Clin. Biochem. 1997; 34: 230–246.
37. Campbell E.J. Alpha-1-antitrypsin deficiency: incidence and detection program. Respir. Med. 2000; 94: S18–21.
38. Snyder M.R., Katzmann J.A., Butz M.L. i wsp. Diagnosis of alpha-1--antitrypsin deficiency: An algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. Clin. Chem. 2006; 52: 2236–2242.
39. Fagerhol M.K. The Pi system. Genetic variants of serum α1-antitrypsin. Ser. 1988; 1: 153–161.
40. Buffone G.J., Stennis B.J., Schimbor C.M. Isoelectric Focusing in Agarose: Classification of Genetic Variants of α_1-antitrypsin. Clin. Chem. 1983; 29: 328–331.
41. Lupi A., Viglio S., Luisetti M. i wsp. Alpha 1-antitrypsin in serum determined by capillary isoelectric focusing. Electrophoresis 2000; 21: 3318–3326.
42. Gershagen S., Janciauskiene S. ELISA for Specific Detection of PiZ-Related α_1-Antitrypsin Deficiency. Clin. Chem. 2004; 50: 2407–2410.
43. Stockley R.A., Campbell E.J. Alpha-1-antitrypsin genotyping with mouthwash specimens. Eur. Respir. J. 2001; 17: 356–359.
44. Costa X., Jardi R., Rodriguez F. i wsp. Simple method for α1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. Eur. Respir. J. 2000; 15: 1111–1115.
45. Rodriguez F., Jardi R., Costa X. i wsp. Rapid Screening for α1-Antitrypsin Deficiency in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Dried Blood Specimens Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 166: 814–817.
46. Andolfatto S., Namour F., Garnier A.L., Chabot F., Gueant J.L., Aimone-Gastin I. Genomic DNA extraction from small amounts of serum to be used for alpha-1-antitrypsin genotype analysis. Eur. Respir. J. 2003; 21: 215–219.
47. Forrest S.M., Dry P.J., Cotton R.G. Use of the chemical cleavage of mismatch method for prenatal diagnosis of α-1-antitrypsin deficiency. Prenatal. Diagn. 1992; 12: 133–137.

48. Tazelaar J.P., Friedman K.J., Kline R.S., Guthrie M.L., Farber R.A. Detection of α1-antitrypsin Z and S mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. Clin. Chem. 1992; 38: 1486–1488.
49. Lucotte G., Sesboue R. Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha 1-antitrypsin variants by duplex PCR assay. Mol. Cell. Probes 1999; 13: 389–391.
50. Rieger S., Riemer H., Mannhalter C. Multiplex PCR assay for the detection of genetic variants of α1-antitrypsin. Clin. Chem. 1999; 45: 688–690.
51. 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: 160–163.
52. Aslanidis C., Nauck M., Schmitz G. High-speed detection of the two common alpha1-antitrypsin deficiency alleles Pi*Z and Pi*S by real-time fluorescence PCR and melting curves. Clin. Chem. 1999; 45: 1872–1875.
53 . 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: 156–161.
54. Ortiz-Pallardó M.E., Zhou H., Fischer H.P. i wsp. Rapid analysis of α1-antitrypsin PiZ genotype by a real-time PCR approach. J. Mol. Med. 2000; 78: 212–216.
55. Kaczor M.P., Sanak M., Szczeklik A. Rapid and inexpensive detection of alpha1-antitrypsin deficiency-related alleles S and Z by a real-time polymerase chain reaction suitable for a large-scale population-based screening. J. Mol. Diagn. 2007; 9: 99–104.
56. Orrù G., Faa G., Pillai S. i wsp. Rapid PCR real-time genotyping of M-Malton alpha1-antitrypsin deficiency alleles by molecular beacons. Diagn. Mol. Pathol. 2005; 14: 237–242.
57. Lodewyck L., Vandevyver C., Vandervorst C., van Steenbergen W., Raus J., Michiels L. Mutation Detection in the alpha-1-antitrypsin gene (PI) using denaturing gradient gel electrophoresis. Hum. Mutat. 2001; 18: 243–250.
58. Hayes V.M. Genetic diversity of the alpha-1-antitrypsin gene in Africans using a novel genotyping assay. Hum. Mutat. 2003; 22: 59–66.
59. Ljujic M., Nikolic A., Divac A., Djordjevic V., Radojkovic D. Screening of alpha-1-antitrypsin gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). J. Biochem. Biophys. Methods 2006; 68: 167–173.
60. Ortiz-Pallardó M.E., Ko Y., Sachinidis A., Vetter H., Fischer H.P., Zhou H. Detection of alpha-1-antitrypsin PiZ individuals by SSCP and DNA sequencing in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: a comparison with immunohistochemical analysis. J. Hepatol. 2000; 32: 406–411.
61. Bals R., Koczulla R., Kotke V., Andress J., Blackert K., Vogelmeier C. Identification of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency by a targeted screening program. Resp. Med. 2007; 101: 1708–1714.