

Joanna Chorostowska-Wynimko<sup>1</sup>, Radosław Struniawski<sup>1</sup>, Beata Popławska<sup>1</sup>,  
 Maria Borszewska-Kornacka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Immunologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie  
 Kierownik: prof. nadzw. dr hab. n. med. J. Chorostowska-Wynimko

<sup>2</sup>Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
 Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Borszewska-Kornacka

## Ocena częstości występowania głównych alleli deficytowych genu alfa-1 antytrypsyny w populacji województwa mazowieckiego — wstępne wyniki badania przesiewowego noworodków

The incidence of alpha-1-antitrypsin (A1AT) deficiency alleles in population of  
 Central Poland — preliminary results from newborn screening

Praca powstała w ramach projektu N 404 081539 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

### Streszczenie

Wrodzony niedobór alfa-1 antytrypsyny, jest jedną z trzech najczęstszych chorób genetycznych rasy kaukaskiej, wiąże się z istotnie wyższym ryzykiem rozwoju postępujących chorób płuc, zwłaszcza przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Dane na temat częstości występowania tego niedoboru w populacji polskiej są niepełne, brakuje badań wykonanych w dostatecznie dużych i przekrojowych grupach populacyjnych. W pracy zaprezentowano wstępne wyniki badania przesiewowego realizowanego w populacji noworodków z Mazowsza.

Analizę genotypu metodą *real-time* PCR i stężenia alfa-1 antytrypsyny metodą nefelometryczną we krwi pobranej na bibułę (DBS) wykonano w grupie 658 noworodków. Allele zmutowane Pi\*Z i Pi\*S wykryto u 28 dzieci, odpowiednio 2,8% i 1,5%. Ich obecność korespondowała z istotnie niższym stężeniem białka A1AT we krwi. Szacowana częstość występowania alleli niedoborowych wynosi dla Pi\*Z — 13,7/1000 (95% CI 5,8–21,5), dla Pi\*S — 7,6/1000 (95% CI 1,7–13,5), natomiast częstość występowania głównego genotypu deficytowego ZZ 1/5345. Badanie jest kontynuowane.

**Słowa kluczowe:** wrodzony niedobór alfa-1 antytrypsyny, allel S, allel Z; genotypowanie, stężenie we krwi, noworodki  
**Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 5: 450–453**

### Abstract

Inherited alpha-1 antitrypsin deficiency (A1ATD) is listed among the three most common genetic disorders in Caucasians. It considerably increases the risk of progressive obstructive lung diseases, mostly chronic obstructive pulmonary disease. Data on the A1ATD prevalence in Poland are scarce, no studies with large enough groups representative for whole Polish population have been performed. Here, we present the preliminary data on the incidence of A1AT main deficiency alleles from the newborn screening in Mazovia (Central Poland) region. Real-time PCR genotyping and A1AT blood concentration measurement by nephelometry were performed from the dry blood spots (DBS) samples of 658 newborns. Deficiency alleles Pi\*Z i Pi\*S were present in 28 children, respectively in 2.8% and 1.5%. Their existence corresponded with significantly lower A1AT blood concentration. Estimated incidence of deficiency alleles was 13,7/1000 (95% CI 5.8–21.5) for Pi\*Z and 7.6/1000 (95% CI 1.7–13.5) for Pi\*S. The calculated prevalence for the main deficiency genotype ZZ was 1/5345. The study is on-going.

**Key words:** alpha-1 antitrypsin deficiency; S allele, Z allele; genotyping, blood concentration, DBS, prevalence, newborns, Poland  
**Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 5: 450–453**

**Adres do korespondencji:** prof. nadzw. dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Immunologii IGIChP, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (22) 431 21 58, faks: (22) 431 23 58, e-mail: immuno@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 21.07.2012 r.  
 Copyright © 2012 Via Medica  
 ISSN 0867–7077

Niedobór alfa-1 antytrypsyny (A1AT), osoczowego inhibitora proteaz serynowych, jest jednym z najczęstszych zaburzeń dziedzicznych rasy białej. Sprzyja rozwojowi różnorodnych patologii w obrębie układu oddechowego, zwłaszcza u osób narażonych na działanie dymu tytoniowego lub szkodliwych czynników zawodowych/środowiskowych [1]. Manifestacje kliniczne wrodzonego niedoboru A1AT są różnorodne, począwszy od wczesnej rozedmy płuc u młodych dorosłych prowadzącej do inwalidztwa oddechowego, aż po przewlekłe postępujące rozstrzenie oskrzeli i przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) [2].

Kodujący A1AT gen *SERPINA1* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 14 cechuje się znacznym polimorfizmem. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 130 odmian genetycznych białka A1AT będących efektem mutacji zachodzących w obrębie tego genu. Jego prawidłowa struktura umożliwia syntezę białka o prawidłowej aktywności (wariant M), które osiąga we krwi stężenie gwarantujące utrzymanie równowagi proteazowo-antyproteazowej w organizmie, a zwłaszcza w układzie oddechowym. Dwa najczęstsze warianty deficytowe allele Z (PI\*Z) i S (PI\*S) wynikają z mutacji genu *SERPINA1* odpowiednio w pozycji Glu342Lys oraz Glu264Val. W ich wyniku dochodzi do syntezy białek A1AT niezdolnych do przyjęcia prawidłowej konformacji przestrzennej cząstek. W efekcie podlegają one wewnątrzkomórkowej akumulacji (białko Z) bądź bezpośredniej degradacji (białko S) w hepatocytach, co prowadzi do krytycznego obniżenia stężenia A1AT w krwiobiegu [3].

Dostępne dane epidemiologiczne wskazują, że ciężki homozygotyczny niedobór A1AT (PIZZ) w Europie jest częstszy w krajach skandynawskich (częstość alleli 2,3%) niż na południu kontynentu (częstość alleli 1,0%), średnio 1 na 4727 noworodków rasy białej [4]. Polska jest jednym z nielicznych krajów Europy, który nie posiada pełnych danych na temat częstości występowania niedoboru A1AT.

Poniżej przedstawiono wstępne wyniki badania, którego celem jest analiza występowania głównych alleli deficytowych Z i S wśród mieszkańców Mazowsza.

## Materiał i metody

### Grupa badana

Badaniem objęto wszystkie dzieci żywe, urodzone w okresie pomiędzy 1 września a 31 grudnia 2011 w Szpitalu Klinicznym Ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie, łącznie 658 noworodków. Wszystkim rodzicom przedstawiono wyczerpującą

informację na piśmie o celach badania i uzyskano ich pisemną zgodę na udział dzieci w badaniu, które uzyskało akceptację stosownej Komisji Bioetycznej.

Materiał stanowiła krew pępowinowa lub żylna pobierana na bibułę (DBS, *dry blood spots*). Wszystkie analizy wykonywano na podstawie materiału izolowanego z 3 krążków bibuły o średnicy 13 mm.

## Metody

### Pomiar stężenia A1AT

Stężenie alfa-1 antytrypsyny mierzono w materiale DBS metodą nefelometryczną w analizatorze IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Stany Zjednoczone) za pomocą zestawu odczynników zawierającego kozie przeciwciała przeciwko ludzkiej A1AT (Beckman-Coulter, Stany Zjednoczone). Wartości stężenia alfa-1 antytrypsyny w materiale badanym odczytywano z krzywej standardowej o zakresie 20–250 mg/dl, wyznaczonej według procedury opisanej przez Giorrini i wsp. [5].

### Genotypowanie A1AT

Do analizy genotypowej A1AT wykorzystano eluat DBS przygotowany za pomocą zestawu Extract-N-Amp Blood PCR Kits (Sigma-Aldrich), jak opisano wcześniej [6]. Identyfikację dwóch najczęściej występujących mutacji w genie *A1AT* (Z i S) przeprowadzono metodą *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*) z użyciem dwóch sond hydrolizujących znakowanych fluorescencyjnie (VIC, FAM), wykrywających w jednej reakcji PCR allel natywny (bez mutacji S lub Z) oraz allel zmutowany A1AT (PI\*S lub PI\*Z). Sekwencje primerów i sond oraz skład i warunki reakcji PCR podano w pracy Struniawskiego i wsp. [6].

Do oceny istotności statystycznej różnic zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Częstość występowania alleli niedoborowych Z i S, oraz genotypów A1AT wyliczono na podstawie równania Hardy-Weinberga.

## Wyniki

U 630 spośród 658 badanych dzieci (95,7%) nie stwierdzono obecności allelu deficytowego PI\*Z lub PI\*S. Allele zmutowane wykryto u 28 dzieci, allel PI\*Z u 18 (2,8%) i allel PI\*S u 10 (1,5%). Stężenie białka A1AT we krwi dzieci w obu grupach niedoborowych było istotnie niższe (tab. 1).

Na podstawie uzyskanych wyników oszacowano częstość występowania alleli niedoborowych Z i S, odpowiednio PI\*Z — 13,7 na 1000 osób (95% CI 5,8–21,5) oraz PI\*S — 7,6 na 1000 osób (95% CI 1,7–13,5). Szacowane częstości występowania poszczególnych genotypów przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 1. Zależność pomiędzy obecnością allelu deficytowego PI\*Z lub PI\*S w genotypie a stężeniem białka A1AT we krwi obwodowej badanych noworodków. Znamienność statystyczna różnic względem grupy Nie-S Nie-Z została oszacowana nieparametrycznym testem Kruskala-Wallis**

**Table 1. Peripheral blood A1AT concentration in respective newborns groups with PI\*Z or PI\*S alleles. Statistical significance towards non-S non-Z group was calculated by the non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis on variance**

Typ allelu <i>Allele type</i>	Średnie stężenie białka A1AT we krwi <i>Mean A1AT concentration in the blood</i>	SD	95% Przedział ufności <i>95% Confidence interval</i>	P
Nie-S Nie-Z/ <i>Non-S Non-Z</i>	220,09	48,39	185,17–247,44	
PI*Z	138,43	16,65	127,68–150,69	p < 0,000*
PI*S	178,14	32,90	158,23–199,92	p < 0,000*

**Tabela 2. Szacowane częstości występowania głównych genotypów zawierających allele deficytowe PI\*Z lub PI\*S**

**Table 2. Estimated frequency for A1AT deficiency genotypes with PI\*Z or PI\*S alleles**

Szacowana częstość występowania genotypu (1/Hardy-Weinberg)  
*Estimated genotype frequency (1/Hardy-Weinberg)*

Nie-S Nie-Z <i>Non-S Non-Z</i>	Z Nie-S <i>Z Non-S</i>	ZZ	S Nie-Z <i>S Non-Z</i>	SS	SZ
1/1,04	1/37	1/5345	1/67	1/17319	1/4810

## Omówienie

Częstość występowania wrodzonego niedoboru A1AT w Polsce była do tej pory przedmiotem wyrwykowych badań, które koncentrowały się głównie w Małopolsce lub Wielkopolsce [7–10]. Ich interpretację utrudnia dodatkowo stosunkowo mała, w kontekście szacowanej częstości występowania niedoboru w Polsce, liczebność badanych grup (630–1262 zdrowych osób) [8–12]. Na podstawie metody elektroogniskowania, Kowalska i wsp. analizowali liczbę fenotypów i częstość alleli kodujących A1AT dla dorosłej populacji województwa poznańskiego, stwierdzając częstość alleli PI\*Z i PI\*S w badanej populacji, 15 i 14,2 na 1000 [10]. Kaczor i wsp. przebadali 859 dorosłych mieszkańców Krakowa, stosując nowoczesną metodę *real-time* PCR, oceniając częstość PI\*Z i PI\*S odpowiednio na 10,5 i 17,5 na 1000 [8]. Z kolei w małej licznie grupie mieszkańców Pomorza Gdańskiego (228 osób) dane kształtowały się jeszcze inaczej, PI\*Z — 15,3; PI\*S 21,9 na 1000 mieszkańców [11]. Analiza statystyczna wymienionych prac wykonana przez Kaczora i wsp. oszacowała średnią częstość PI\*Z i PI\*S na odpowiednio 14,5 i 10,9 na 1000 w łącznej grupie 2653 osób badanych przy zastosowaniu bardzo zróżnicowanych metod laboratoryjnych [8].

Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wstępne wyniki wydają się wskazywać na zbliżoną częstość występowania allelu deficytowego PI\*Z (13,7 na 1000) i nieco niższą allelu PI\*S (7,6 na 1000). Jednak szacowana częstość występowania głównego genotypu deficytowego ZZ jest w badanej przez autorów tej pracy populacji, 1 na 5345, znacząco większa w porównaniu z szacowaną przez Kaczora i wsp. — 1 na 9110 [8].

Należy podkreślić, że w pełni wiarygodne dane zostaną uzyskane dopiero po przebadaniu dostatecznie dużej grupy dzieci, docelowo około 4000 noworodków. Według wykonanych szacunków uwzględniających częstość PI\*Z jest to grupa dostatecznie liczna.

Istotne znaczenie ma również dobór odpowiednio czulej i wiarygodnej metody badawczej. Jedyne polskie badanie, do którego zrekrutowano relatywnie dużą liczbę zdrowych ochotników (3560 osób) przeprowadzono na początku lat 70. XX wieku. Jednak do oceny fenotypu A1AT zastosowano w nim metodę elektroforezy w żelu skrobiowym, zarzuconą obecnie ze względu na niezadowalającą czułość [7]. Jej niedoskonałość obrazują uzyskane wyniki — częstość PI\*Z i PI\*S odpowiednio 1,4 oraz 15,6 na 1000.

Należy podkreślić, że zastosowana przez autorów tego doniesienia metodyka pracy wykorzystuje nie tylko najnowsze techniki analizy gene-

tycznej (*real-time* PCR), których przydatność potwierdzili już Kaczor i wsp. [8], ale również nie stosowaną do tej pory metodę pobierania materiału biologicznego, która pozwala na mało inwazyjne, wygodne pobieranie i przesyłanie próbek krwi od noworodków na bibułę w ramach rutynowych badań przesiewowych w kierunku chorób uwarunkowanych genetycznie. Absolutnie unikalnym osiągnięciem jest również wdrożenie testu umożliwiającego wykonanie analizy stężenia A1AT w kilku kroplach krwi pobranych na bibułę.

### Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

### Podziękowania

Autorzy wyrażają wdzięczność Polskiej Fundacji na Rzecz Chorych z Niedoborem Alfa-1 Antytrypsyny za nieocenioną pomoc w realizacji badania.

### Piśmiennictwo

1. Chorostowska-Wynimko J., Popławska B., Janciauskiene S. Alfa-1 antytrypsyna: rola w fizjologii i patologii człowieka. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. Family Med.* 2012; 18: 22–28.
2. Chorostowska-Wynimko J., Niżankowska-Mogilnicka E., Bakula A. i wsp. Zasady postępowania diagnostycznego i opieki nad chorymi z wrodzonym niedoborem alfa-1 antytrypsyny. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2010; 78: 348–355.
3. Popławska B., Janciauskiene S., Chorostowska-Wynimko J. Genetyczne warianty alfa-1 antytrypsyny: klasyfikacja i znaczenie kliniczne. *Pneumonol. Alergol. Pol.* (zaakceptowana do druku)
4. Blanco I., de Serres F.J., Fernandez-Bustillo E. i wsp. Estimated numbers and prevalence of PI\*S and PI\*Z alleles of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur. Respir. J.* 2006; 27: 77–84.
5. Gorrini M., Ferrarotti I., Lupi A. i wsp. Validation of a rapid, simple method to measure alpha1-antitrypsin in human dried blood spots. *Clin. Chem.* 2006; 52: 899–901.
6. Struniawski R., Szpechcinski A., Popławska B. i wsp. Rapid DNA extraction protocol for the alpha-1 antitrypsin deficiency detection from dried blood spots by real-time PCR. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 756, DOI 10.1007/978-94-007-4549.
7. Opolska B. Badania nad częstością występowania fenotypów układu PI w populacji Polski Południowej. *Przegl. Lek.* 1974; 31: 851–854.
8. Kaczor M. P., Sanak M., Libura-Twardowska M., Szczeklik A. The prevalence of alpha1-antitrypsin deficiency in a representative population sample from Poland. *Respir. Med.* 2007; 101: 2520–2525.
9. Titenko-Holland N.V., Kowalska A. Alpha-1-antitrypsin (PI) subtypes in Russians and Poles. *Hum. Hered.* 1992; 42: 384–386.
10. Kowalska A., Rujner J. Polimorfizm lokus Pi (alpha1-antitrypsyny) u mieszkańców województwa poznańskiego. *Pol. Tyg. Lek.* 1994; 49: 195–197.
11. Walter H., Danker-Hopfe H., Lemmermann M., Lorenz M. Investigations on the variability of four genetic serum protein markers in Poland. *Z. Morphol. Anthropol.* 1992; 79: 203–214.
12. Kowalska A., Rujner J., Titenko-Holland N.V., Pilacik B. Alpha-1-antitrypsin subtypes in Polish newborns. *Hum. Hered.* 1995; 45: 351–354.