

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.711>

<https://orcid.org/0009-0001-8946-8261>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Edita Poluziorovienė

Alfa-1 antitripsino variantų priežastinis ryšys su ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Arūnas Valiulis (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Vaidotas Urbonas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Zachi Grossman (Arielio universitetas, Izraelis, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Odilija Rudzevičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Danielius Serapinas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Eglė Vaitkaitienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. gruodžio 11 d. 15 val. VUL Santaros klinikos, Santariškių g. 7, Didžiojoje auditorijoje Nr. A 101.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.711>

<https://orcid.org/0009-0001-8946-8261>

VILNIUS UNIVERSITY

Edita Poluzioroviene

Causative Relationship Between Alpha-1 Antitrypsin Variants and Bronchial Obstruction Syndrome in Preschool Children

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2024

This dissertation was written between 2019 and 2023 at Vilnius University

Academic supervisor: Prof. Habil. Dr. Arūnas Valiulis (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Doctoral advisor: Prof. Dr. Algirdas Utkus (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Vaidotas Urbonas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Zachi Grossman (Adelson School of Medicine, Ariel University, Israel, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Odilija Rudzevičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Danielius Serapinas (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Eglė Vaitkaitienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 3p.m. on the 11th of December 2024 in VUL Santaras clinics, Santariškių st. 7 Great audience no. A 101.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	9
1. Problemos aktualumas	9
2. Darbo mokslinis naujumas.....	11
3. Darbo tikslas	13
4. Darbo uždaviniai	13
5. Teorinė ir taikomoji darbo reikšmė.....	14
6. Ginamieji disertacijos teiginiai	17
LITERATŪROS APŽVALGA	18
7. Alfa-1 antitripsino deficito istorinės detalės	18
8. Alfa-1 antitripsinas, SERPINA1 genas ir alfa-1 antitripsino deficitas.....	19
8.1. Alfa-1 antitripsinas kaip antiproteazinės sistemos dalis	19
8.2. Alfa-1 antitripsino baltymą koduojantis SERPINA1 genas.....	22
8.3. Alfa-1 antitripsino deficitas	27
9. Alpha-1 antitripsino deficito diagnostikos galimybės.....	28
9.1. Alpha-1 antitripsino koncentracijos nustatymas nefelometrijos metodu	29
9.2. Alpha-1 antitripsino koncentracijos nustatymas turbidimetrijos metodu	29
9.3. Alpha-1 antitripsino fenotipavimas ir genotipavimas	29
10. Epidemiologija	32
11. Alfa-1 antitripsino deficito klinikinė reikšmė	33
12. Alfa-1 antitripsino deficito ryšys su LOPL ir emfizema.....	36
13. AATD ir bronchų astma suaugusiesiems ir vaikams	38
14. AATD ir kepenų ligos suaugusiesiems ir vaikams	40
TYRIMO METODAI.....	45
15. ALSPAC kohortos tiriamoji grupė.....	45
15.1. Tyrimo imtis ir tiriamųjų atranka	45
15.2. Bioetikos reikalavimai	45
15.3. Duomenų rinkimas	45

15.4. Tyrimo metodai	46
15.5. Statistinės analizės metodai ALSPAC kohortai.....	47
16. PresWeezAging LT kohorta.....	48
16.1. Tyrimo imtis ir tiriamųjų atranka	48
16.2. Bioetikos reikalavimai.....	49
16.3. Duomenų rinkimas	49
16.4. Tyrimo metodai	50
16.5. Statistinės analizės metodai	51
REZULTATAI	53
17. ALSPAC kohorta	53
17.1. Tiriamosios grupės charakteristika	53
17.2. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmai tarp bronchų astma sergančių vaikų.....	55
17.3. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų pasiskirstymas tarp švokštimo fenotipų	57
18. PresWeezAging LT kohorta.....	59
18.1. Pagrindinės ir kontrolinės grupių charakteristika	59
18.2. Pagrindinės ir kontrolinės grupių klinikinės charakteristikos.....	60
18.3. Pi*Z ir Pi*S alelių dažniai, palyginti su kitomis kohortomis	65
18.4 .Tikėtinas alfa-1 antitripsino deficitą lemiančių genotipų dažnis	67
REZULTATŲ APTARIMAS	68
IŠVADOS.....	74
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	75
DARBO TĘSTINUMAS.....	76
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	77
PRIEDAI	101
SANTRAUKA	110
PADĖKA.....	137
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	138

SANTRUMPOS

AAT – alfa-1 antitripsinas.

AATD – alfa-1 antitripsino deficitas.

ALSPAC – *Avon Longitudinal Study of Parents and Children*, liet. *Eivono tėvų ir jų vaikų ilgalaikis tyrimas*.

BA – bronchų astma.

FDR – klaidingo atradimo koeficientas (angl. *false discovery rate*).

IEF – izoelektrofokusavimas.

IAPŠ – ikimokyklinio amžiaus protarpinis (pasikartojantis) švokštimas.

LOPL – lėtinė obstrukcinė plaučių liga.

MAIŠ – mokyklinio amžiaus išliekantis švokštimas.

NŠ – nuolatinis švokštimas.

NVŠ – niekada / vienkartinis švokštimas.

PresWeezAging LT – angl. *Cohort of Preschool Children with Wheezing Syndrome for the Study of Aging-Related Diseases*, liet. *Ikimokyklinio amžiaus vaikų, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, kohorta nuo amžiaus priklausomų ligų tyrimams*.

PSA – prostatos specifinis antigenas.

rs – rsID numeris („rs“, po kurios eina skaičius) yra unikali etiketė, kurią tyrėjai ir duomenų bazės naudoja konkrečiam VNP (vieno nukleotido polimorfizmui) identifikuoti.

rs6647 – M1-Ala213; M1-Val213 fenotipas.

rs11832 – 3'neišverstas regionas.

rs17580 – S Glu264Val fenotipas.

rs709932 – M2 Arg101His fenotipas.

rs1243160 – introno variantas.

rs2854254 – introno variantas.

rs8004738 – 5'neišverstas regionas.

rs17751769 – introno variantas.

rs28929470 – F Arg223Cys fenotipas.

rs28929474 – Z Glu342Lys fenotipas.

SR – santykinė rizika.

ŠS – šansų santykis.

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas.

VVIŠ – vėlyvos vaikystės išliekantis švokštimas.

VVPŠ – vidurio vaikystės protarpinis (pasikartojantis) švokštimas.

IVADAS

1. Problemos aktualumas

Ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromas yra viena dažniausių ir iki šiol mažai tyrinėtų vaikų sveikatos problemų, varginančių daugiau kaip 50 % vaikų iki šešerių metų (1) ir stipriai veikiančių vaiko bei jo šeimos sveikatą, gyvenimo kokybę, didinančių iki hospitalinės bei hospitalinės sveikatos priežiūros išlaidas. Švokštimas gali būti ūminis, protarpinis (pasikartojantis) arba lėtinis. Jis atsiranda dėl įvairių priežasčių, įskaitant anatominius sutrikimus ir aplinkos veiksnius. Genetiniai veiksniai gali lemti mažų vaikų polinkį į švokštimą, sergant kvėpavimo takų virusine infekcija (2). Ankstesni tyrimai parodė, kad mažiems vaikams, turintiems ORMDL3 (sfingolipidų biosintezės reguliatoriaus rizikos alelį) ir GSDMB (gasdermino B) rizikos alelį, švokštimo rizika yra didesnė (3, 4). Manoma, kad ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimas yra heterogeninis sutrikimas, tik kai kuriems iš šių vaikų švokštimas išlieka ir vėlesniame amžiuje išsivysto į bronchų astmą (BA) ir, galbūt, kitas obstrukcines kvėpavimo takų ligas (5). Naujausi tyrimai koncentruojasi į švokštimo sindromo fenotipus, endotipus kaip tiesiausią kelią į personalizuotą mediciną ir efektyvų šio sindromo valdymą (6–8). Šios problemos aspektas yra švokštimo sindromo ilgalaikė prognozė, šio sindromo evoliucija į vyresnių vaikų ir suaugusiųjų bronchų astmą, lėtinę obstrukcinę kvėpavimo ligą ir kt. Iki šiol nėra patikimų prognostinių faktorių, kurie leistų prognozuoti, kuriems vaikams pasikartojantys švokštimo epizodai pasibaigs sulaukus 6–7 m., o kuriems vyresniame amžiuje jie kartosis, ir kaip ankstyvo amžiaus vaikų švokštimų prognozę keičia įvairios terapinės intervencijos.

Mažų vaikų švokštimo sindromo diagnostinių ir prognostinių (vidutinės, ilgalaikės trukmės) žymenų paieška priklauso nuo kelių aplinkybių, t. y. apima klinikinius požymius (9), virusų rūšį (RV vs RSV) (10), šeiminę, pirmiausia – atopinių ligų, anamnezę (11), periferinio kraujo ir (ar) nosies sekreto eozinofiliją (12), bendrą ir specifinius imunoglobulinus E (13), azoto oksido koncentraciją iškvėpiamame ore (14), įvairias iškvėpto oro kondensato frakcijas (15, 16) ir kt.

Žinoma, kad alfa-1 antitripsino deficitas (AATD), kuris yra vienas dažniausių retųjų sveikatos būklių Europoje, kliniškai manifestuoja įvairiais simptomais, tačiau dažniausiai pažeidžiamos kepenys ir plaučiai (17). Kita vertus, šiandien AATD diagnozuojamas mažiau kaip 10 % tikėtinais paveiktų asmenų (18). Įrodytas ryšys tarp AATD ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL). Tiek homozygotinių, tiek heterozygotinių mutacinių alelių Pi*Z ir Pi*S dažniai yra kur kas didesni LOPL pacientų, palyginti su sveikais

suaugusiais bendraamžiais (19). AATD genotipų ryšį su LOPL patvirtina dar ir tai, kad esant šioms genotipams, LOPL, kuri šiuo metu laikoma išimtinai senyvo amžiaus žmonių liga, pasireiškia daug jaunesniame suaugusiųjų amžiuje (20).

Epidemiologiniuose ir ilgalaikio populiacinio naujagimių kohortų stebėjimo tyrimuose buvo patvirtinta, kad pasikartojantis švokštimas ankstyvoje vaikystėje yra susijęs su pasikartojančiais arba nuolatiniais kvėpavimo ligų simptomais, dažnesne bronchų astmos (21) ir LOPL diagnoze (22, 23) suaugus.

Iš kitos pusės, AATD statistškai reikšmingai buvo susijęs su ankstyva LOPL diagnoze suaugusiųjų amžiuje ir spartesniu ligos progresavimu, ankstyvesne negalia, trumpesne gyvenimo trukme (24, 25).

AATD yra pagrindinis ir kol kas vienintelis įrodytas paveldimas LOPL ir emfizemos rizikos veiksnys (26).

Tolesni tyrimai parodė, kad AATD mutaciniai variantai, tokie kaip PiMZ, yra susiję su švokštimo epizodais, tačiau iki šiol nebuvo bandyta susieti švokštimo sindromo fenotipų su AATD genotipais, lemiančiais mutacijas, ir išskirti atskiroms vyresnių vaikų ir suaugusiųjų lėtinėms kvėpavimo takų ligoms būdingų nuo AATD genotipų priklausomų ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo fenotipų ir (ar) endotipų.

Nors retrospektyviai vertinant pirmąją AATD naujagimių kohortą Švedijoje (1973 m. gimę naujagimiai, atrinkti naujagimių visuotinės patikros metu) nebuvo pastebėta sąsajų tarp AATD ir vyresnių vaikų sergamumo bronchų astma ar kitų kvėpavimo takų ligų, AATD genotipai tapo mūsų tyrimų taikiniu švokščiančių ikimokyklinio amžiaus vaikų kohortoje. Mums nepavyko rasti kitų perspektyviųjų tyrimų, kuriuose būtų bandoma susieti įvairius AATD genotipus ir ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo fenotipus ir (ar) endotipus, kurie galėtų būti LOPL prognostinis žymuo ar net pirmas LOPL klinikinis pasireiškimas. Skirtingi AATD genotipai galėtų būti susiję su skirtinga pirmojo švokštimo epizodo rizika, didesniu ar mažesniu kvėpavimo nepakankamumu švokštimo epizodo metu, dažnesniu ar retesniu šių epizodų pasikartojimu ikimokykliniame amžiuje, taip pat skirtinga vyresnių vaikų ir suaugusiųjų lėtinių ligų rizika.

Įrodę ryšį tarp AATD homozigotinių ir heterozigotinių genotipų ir švokštimo sindromo, galėtume įveiklinti bronchų astmos ir LOPL rizikos valdymą ir taikyti ankstyvus tikslinės prevencijos ir (ar) gydymo metodus, kurie užtikrintų tiek ankstyvąją vaiko vystymąsi, tiek Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) prioritetu laikomą sveiką senėjimą.

2. Darbo mokslinis naujumas

Disertacinis darbas yra naujas ir pažangus dėl keliamų tikslų, tyrimo metodologijos ir rezultatų bei jų praktinio pritaikymo.

Mokslinis tyrimas koncentravosi į dažniausią, bet iki šiol labai fragmentiškai tyrinėtą ikimokyklinio amžiaus vaikų sveikatos problemą – pasikartojančio švokštimo sindromą ir jo ryšį su bronchų astma paauglystėje bei lėtine obstrukcine plaučių liga (LOPL) suaugusiųjų amžiuje. Iki tol atlikti epidemiologiniai tyrimai parodė, kad kas trečias vaikas iki savo trečiojo gimtadienio turi nors vieną kvėpavimo takų obstrukcijos, t. y. švokščiančio kvėpavimo, epizodą, dažniausiai ūminės kvėpavimo takų infekcijos metu (27). 30 % šių vaikų švokštimo epizodai vėliau kartojasi.

Anksčiau atlikti naujagimių kohortų ilgalaikio stebėjimo tyrimai patvirtino, kad ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromas susijęs su vėliau diagnozuojama bronchų astma ir LOPL, tačiau iki šiol nežinoma, kas lemia, kad vienam švokščiančiam vaikui diagnozuojama lėtinė obstrukcinė kvėpavimo liga, o kitam švokštimo epizodas būna vienetinis arba, pasikartojęs keletą kartų, negrįžtamai išnyksta vyresniame ikimokykliniame amžiuje. Mūsų tyrimo tikslas buvo švokštimo sindromo dekonstrukcija – bandymas ieškoti su viena ar kita lėtine liga susijusių švokštimo fenotipų ir (ar) endotipų, tačiau ne retrospektyviai, kaip buvo daroma iki tol, vertinant savaiminę pasikartojančių švokštimų eigą ir jų evoliuciją į lėtinę kvėpavimo ligą, o perspektyviai vertinant žinomų vyresnių vaikų ar suaugusiųjų lėtinės obstrukcinės kvėpavimo ligos žymenų, mūsų atveju alfa-1 antitripsino genotipų variantų, dažnį švokščiančių ikimokyklinio amžiaus vaikų populiacijoje ir atskirose švokštimo sindromo subpopuliacijose (klinikinių fenotipų grupėse).

Tyrimai atlikti nespecializuotoje ALSPAC (angl. *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*, liet. *Eivono tėvų ir jų vaikų ilgalaikis tyrimas*) kohortoje (Bristolis, JK) ir specializuotoje *PresWeezAging* LT (angl. *Cohort of Preschool Children with Wheezing Syndrome for the Study of Aging-Related Diseases*, liet. *Ikimokyklinio amžiaus vaikų, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, kohorta nuo amžiaus priklausomų ligų tyrimams*) Lietuvos ikimokyklinio amžiaus vaikų su švokštimo sindromu kohortoje, kurią mes ir surinkome. ALSPAC yra kelių kartų, geografiniu požiūriu pagrįstas nespecializuotas kohortinis tyrimas, kuriame dalyvavo 14 541 nėščioji ir vėliau jų gimęs vaikas (-ai), į tyrimą įtraukti 1990–1992 m. Eivono regione, Jungtinėje Karalystėje. Buvo atlikta keletas tyrimų, kuriais siekta įvertinti, ar ALSPAC imtis, kurios dalyviai 1991 m. pildė klausimynus, yra reprezentatyvi, palyginti su visais Eivono regiono gyventojais ir su visa

Didžiąja Britanija. Tėvų ir vaikų, gyvenusių tiriamojame teritorijoje 1970 m., populiacija iš esmės buvo panaši į likusios Didžiosios Britanijos populiaciją. 1991 m. gyventojų surašymo duomenys buvo naudojami siekiant palyginti Eivono rajone gyvenančių motinų su kūdikiais iki 1 metų populiaciją su visos Didžiosios Britanijos populiacija. Paaiškėjo, kad Eivone kūdikių motinos šiek tiek dažniau nei likusioje Didžiosios Britanijos dalyje gyveno nuosavame būste, turėjo automobilį ir buvo baltaodės. Taigi, norint sudaryti reprezentatyvią imtį ir duomenis lyginti su likusia Didžiosios Britanijos populiacija, šiame tyrime šiek tiek trūko nepasiturinčių šeimų (gyvenančių nuomojamame būste, neturinčių automobilio, vienišų ar nesusituokusių sugyventinių) ir etninių mažumų atstovų.

Lietuviškoji kohorta buvo specializuota, ją sudarė tik švokštimo sindromu sergantys ikimokyklinio amžiaus vaikai ir kontrolinė grupė (iš viso 219 vaikų), surinkta 2019–2023 metais. Dvipakopis tyrimo metodas leido įvertinti AAT genotipų su mutacija ryšį ne tik su švokštimo sindromo fenotipais, bet ir su lėtinėmis obstrukcinėmis kvėpavimo ligomis tiek tiesiogiai (švokštimo sindromas plius AAT genotipas, kai yra įvykusi mutacija vs bronchų astma paauglystėje), tiek netiesiogiai (švokštimo sindromas plius AAT genotipas, kai yra įvykusi mutacija vs lėtinė obstrukcinė plaučių liga suaugusiųjų amžiuje).

Mūsų tyrimai leido nustatyti statistškai patikimą ryšį tarp SERPINA1 geno polimorfizmą ir švokštimo fenotipų bei bronchų astmos. Iš kitos pusės, patvirtintas AAT Pi*Z ir Pi*S genotipų ryšys ne tik su bronchų astma, bet ir su LOPL, kuri iki šiol buvo išimtinai suaugusiųjų liga, paprastai diagnozuojama vyresniems negu 50 metų pacientams. Nors ilgalaikiai vaikų kohortiniai tyrimai jau anksčiau buvo patvirtinę, kad švokštimo sindromu ankstyvoje vaikystėje sirgę žmonės du ir daugiau kartų dažniau susergera LOPL suaugusiųjų amžiuje, vaikams LOPL iki šiol nebuvo diagnozuojama, galbūt klaidingai simptomatiką įvardijant kaip vaikų lėtinį (obstrukcinį) bronchitą, lėtinę nepatikslingą kvėpavimo takų ligą. Mūsų rastas ryšys tarp SERPINA1 geno polimorfizmą, švokštimo sindromo fenotipų ir vyresnių žmonių lėtinių kvėpavimo takų ligų leidžia AAT genotipus, kai yra įvykusi mutacija, vertinti ne tik kaip prognostinius žymenis, bet LOPL atveju ir kaip pirmą LOPL klinikinę manifestaciją ankstyvoje vaikystėje. Tai, kad AAT Pi*Z alelį turintiems ir švokštimo sindromu sergantiems vaikams ūminės kvėpavimo takų obstrukcijos epizodo metu AAT koncentracija buvo sumažėjusi, tačiau koncentracijos sumažėjimas šiame amžiuje nesukėlė sunkesnio klinikinio kvėpavimo funkcijos sutrikimo, liudijo, jog ligos mechanizmai, kvėpavimo sistemos kompensaciniai rezervai vaikams ir suaugusiesiems yra skirtingi, nenulemti tik kiekybinių rodiklių. Žinoma, reikia tolesnių tyrimų, kurie galėtų

padėti atskleisti kitus nei AAT koncentracija AAT homo- ir heterozigotinių mutacinių genotipų poveikio mechanizmus lėtinių kvėpavimo takų ligų etiopatogenezeje.

Mūsų tyrimų rezultatai turi svarbią pritaikomąją vertę. Vaikai, kuriuos vargina švokštimo sindromas, kad ir kokio jie būtų amžiaus, turėtų būti tiriami dėl AATD tiek nustatant alfa-1 antitripsino koncentraciją, tiek atliekant fenotipavimą, nes tai gali turėti įtakos ne tik švokštimo sindromo eigai (ūminis, protarpinis, lėtinis), bet ir sergamumui bronchų astma bei lėtine obstrukcine plaučių liga. Šeimos vaikų, kuriems nustatytas AAT genotipas esant mutacijai (tiek homozigotinis, tiek heterozigotinis variantai), turėtų žinoti kvėpavimo obstrukcinėms ligoms specifinės profilaktikos reikalavimus, tokius kaip aktyvus ir pasyvus rūkymo, įskaitant elektronines cigaretes, visiško eliminavimo, namų ir ugdymo įstaigų oro taršos kontrolės, ir jų laikytis, taip pat atsakingai rinktis būsimą vaiko profesiją ir darbo aplinką. Taigi, remiantis mūsų duomenimis, LOPL, anksčiau išimtinai senyvo amžiaus suaugusiųjų lėtinės ligos, specifinė profilaktika turėtų prasidėti ankstyvoje vaikystėje.

3. Darbo tikslas

Ištirti alfa-1 antitripsino genotipų ir SERPINA1 geno polimorfizmą dažnį Jungtinės Karalystės Bristolio ALSPAC (angl. *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*, liet. *Eivono tėvų ir jų vaikų ilgalaikis tyrimas*) populiacinėje vaikų ilgalaikio stebėjimo ir specializuotoje *PresWeeAging* LT (angl. *Cohort of Preschool Children with Wheezing Syndrome for the Study of Aging-Related Diseases*, liet. *Ikimokyklinio amžiaus vaikų, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, kohorta nuo amžiaus priklausomų ligų tyrimams*) Lietuvos ikimokyklinio amžiaus vaikų, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, kohortose ir įvertinti švokštimo sindromo ryšį su sergamumu bronchų astma bei lėtine obstrukcine plaučių liga.

4. Darbo uždaviniai

1. Ištirti SERPINA1 geno polimorfizmą dažnį populiacinėje ALSPAC vaikų kohortoje bei įvertinti ryšį tarp alfa-1-antitripsino variantų ir ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo fenotipų.
2. Ištirti nuo SERPINA1 geno polimorfizmą priklausomų ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo fenotipų ryšį su mokyklinio amžiaus bronchų astma.

3. Surinkti specializuotą Lietuvos ikimokyklinio amžiaus vaikų su švokštimo sindromu kohortą ilgalaikiams su žmogaus senėjimu susijusių ligų tyrimams (PresWheezeAging LT) ir ištirti alfa-1 antitripsino deficito Pi*Z ir Pi*S alelių dažnį specializuotoje švokščiančių vaikų kohortoje bei palyginti su dažniu vaikų be kvėpavimo obstrukcinių ligų (kontrolinėje) grupėje bei tarp LOPL.
4. Vaikams iki 72 mėnesių amžiaus švokštimo epizodo metu ištirti alfa-1 antitripsino koncentraciją kraujyje ir įvertinti jos galimą ryšį su kvėpavimo funkcijos sutrikimo sunkumu.
5. Įvertinti nuo SERPINA1 geno polimorfizmų priklausomų ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo fenotipų galimą ryšį su mokyklinio amžiaus vaikų bronchų astma ir suaugusiųjų lėtine obstrukcine plaučių liga.

5. Teorinė ir taikomoji darbo reikšmė

Alfa-1 antitripsinas yra kraujyje cirkuliuojantis baltymas, kurio pagrindinė funkcija – neutralizuoti įvairių baltymus skaidančių fermentų (proteazių) aktyvumą (28). Pagrindiniai alfa-1 antitripsino taikiniai fermentai yra neutrofilinė elastazė, tripsinas, chimotripsinas, bakterijų proteazės ir katepsinas G.

Alfa-1 antitripsiną koduoja SERPINA1 genas. Iki šiol nustatyta per 130 skirtingų alelių mutacijų, kai kurios iš jų lemia alfa-1 antitripsino koncentracijos sumažėjimą (deficitą). Įrodytos alfa-1 antitripsino deficito sąsajos su plaučių emfizemos ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos atsiradimo rizika suaugusiems ir kepenų ligomis tiek suaugusiems, tiek vaikams. Tačiau alfa-1 antitripsinas organizme atlieka ir kitas funkcijas (29), taip pat dalyvauja moduluojant uždegiminį procesą (30). Buvo pastebėta, kad oksidacinio streso rodikliai ryškesni vaikams, turintiems deficingių alfa-1 antitripsino alelių (31), o Pi*Z alelis pasižymi uždegimą skatinančiomis savybėmis (32). Svarbi yra alfa-1 antitripsino savybė slopinti azoto oksido, kuris yra uždegimo ir netiesioginis kvėpavimo takų eozinofilijos rodiklis bronchų astmos atvejais, gamybą (33). Manoma, kad proteazių inhibitoriai (įskaitant alfa-1 antitripsiną) turi įtakos bronchų astmos paūmėjimams (34). Atsižvelgiant į šiuos pastebėjimus, alfa-1 antitripsinas taip pat gali būti reikšmingas ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo metu.

Pagal vėliausią Europos respiratologų draugijos ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo klasifikacijos ir gydymo atnaujinimą (35), vaikų švokštimo skirstymas į epizodinį virusinį švokštimą ir dauginių dirgiklių švokštimą yra supaprastintas ir turėtų būti naudojamas labai atsargiai. Kita vertus, kai kurie

švokštimo bruožai (pvz., sunki ligos eiga) gali prisidėti prie švokštimo fenotipo savitumo ir prognostinės vertės (36). Taip pat pastebėti šių švokštimo tipų patogeneziniai ypatumai ir galimas skirtingas atsakas į gydymą (37). Manoma, kad individualus organizmo kvėpavimo takų atsakas ir klinikinė išraiška virusinių kvėpavimo takų infekcijų metu galbūt lemia kvėpavimo takų ligų riziką vėlesniame amžiuje.

Buvo tiriamos galimos mokyklinio amžiaus vaikų AAT fenotipų asociacijos su bronchų astma, tačiau nėra aprašyta tyrimo, kuriame būtų tiriami ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo ypatumai ir ryšys su alfa-1 antitripsino koncentracija bei genotipais. Alfa-1 antitripsino genotipai, kai yra įvykusi mutacija, gali būti susiję su didesne švokštimo rizika ikimokykliniame amžiuje ir alfa-1 antitripsino koncentracija švokštimo epizodo metu gali skirtis nuo įprastinės sveikiems vaikams, nes alfa-1 antitripsinas didėja tiek alerginio (eozinofilinio), tiek įprasto uždegimo metu (38).

Kadangi alfa-1 antitripsinas priklauso ūmios fazės baltymų grupei, skirtingas atsakas (AAT koncentracijos didėjimas ir (ar) pokyčiai) gali turėti įtakos švokštimo klinicinei eigai, todėl kuo išsamesnis ligos klinikinio pasireišimo vaizdas padėtų tiksliau atrinkti rizikos grupes.

Tęstinių tyrimų metu buvo įtartas švokštimo epizodų ryšys su alfa-1 antitripsino genotipais, turinčiais mutacinių alelių (PiMZ). Taip pat nustatytas ryšys tarp ankstyvo praeinančio švokštimo fenotipo ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos rizikos genų (39). Tai rodo, kad pradinė lėtinių kvėpavimo takų ligų patogenezės grandis yra pažeidimai, įvykę iki gimimo ar pirmaisiais gyvenimo metais. Nustatius alfa-1 antitripsino genotipų ryšį su švokštimo fenotipais būtų galima anksti įvertinti lėtinės obstrukcinės plaučių ligos riziką ir taikyti ankstyvos prevencijos priemones.

AATD turintys pacientai susiduria su trimis pagrindinėmis problemomis: a) nepakankamai gerai diagnozuojama liga; b) didelis klinikinis kintamumas; c) specifinio ligos gydymo galimybių trūkumas. Viename iš epidemiologinių tyrimų buvo apskaičiuotas Pi*S ir Pi*Z alelių dažnis 97 pasaulio šalyse. Manoma, kad daugiau nei 180 000 (0,1 %) ir 1,2 milijono (0,7 %) asmenų atitinkamai turi PiZZ ir PiSZ fenotipus, iš kurių daugiau nei 90 % lieka nediagnozuoti (40). Kadangi ankstyvieji ligos simptomai yra panašūs į kitų kvėpavimo takų patologijų simptomus, pradinė klinikinė diagnozė yra sudėtinga, ypač naujagimiams ir vaikams. Be to, nepakankamas ligos diagnozavimas, kai vidutinis diagnozės vėlavimas yra 5–10 metų, gali neigiamai paveikti pacientų ligos prognozę (41, 42).

Pacientų, kuriems diagnozuotas AATD, simptomų sunkumo ir galimų baigčių skirtumai yra reikšmingi, nes nei AAT koncentracija serume, nei genotipas nesuteikia tikslių prognozių dėl sunkios plaučių ar kepenų ligos

išsivystymo. Šie duomenys rodo, kad papildomi veiksniai, įskaitant genetiką, epigenetiką, aplinką ir gyvenimo būdą, gali turėti įtakos ligos sunkumui. Todėl būtina taikyti naujoviškus metodus, kad būtų galima anksčiau diagnozuoti AATD ir nustatyti naujus prognostinius biožymenis, ir taip pagerinti pacientų ligos išeitis ir sumažinti sergamumą bei mirtingumą (43).

AAT trūkumo (AATD) paplitimas Jungtinėse Amerikos Valstijose yra nuo 1 iš 2857 iki 1 iš 5097, daugiausia Europos kilmės baltųjų populiacijose, o sergamumas panašus į sergamumą cistine fibroze. Bendroje populiacijoje taip pat yra matoma, kad AATD dažnis mūsų regione yra gana didelis, todėl epidemiologinis mūsų tyrimo kontekstas yra ne mažiau svarbus nei klinikinis.

Yra žinoma, kad cigarečių rūkymas labai pajaunina ligos pradžios amžių ir padidina riziką sirgti lėtine obstrukcine plaučių liga asmenims, turintiems AATD (44). Ankstyvas ir savalaikis AATD nustatymas leidžia šiems asmenims laiku sužinoti apie savo būklę, priimti tinkamus sprendimus dėl gyvenimo būdo pasirinkimo, numatyti draudimo ir medicininius poreikius bei įvertinti karjeros pasirinkimo galimybes. Tačiau svarbiausias sprendimas gali būti susijęs su rūkymu. Kadangi rūkyti dažnai pradedama paauglystėje, ir, deja, bet vaikų amžius jaunėja, šis faktorius tampa dar svarbesnis, nes genetinis tyrimas dėl AATD gali turėti įtakos jų ateities įpročiams, gyvenimo būdai ir sveikatai (45).

Per pastarąjį dešimtmetį ryškėja naujos AAT pakaitinės terapijos (angl. *augmentation therapy*) indikacijos, nes tyrimai rodo saugų, priešūždegiminį, imunomoduliuojantį ir audinius apsaugantį AAT funkcinį poveikį. Nors šis pakaitinės terapijos metodas sukėlė daug diskusijų, tai yra kol kas vienintelis patvirtintas farmakologinis gydymas, skirtas konkrečiai gydyti sunkią plaučių ligą AATD sergantiems pacientams. Kadangi šiuo metu nėra jokios farmakologinės metodikos su AATD susijusiai kepenų ligai gydyti, mokslininkai tiria naujus gydymo būdus, tokius kaip genų terapija, indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės ir genų „nutildymo“ strategijos, kad būtų išvengta AAT polimerizacijos hepatocituose (43).

AAT atlieka daug funkcijų organizme, tad ir šio baltymo poveikis įvairioms organizmo sistemoms bei organams yra neabejotinas. Ir apie tai kalba vis daugiau naujų tyrimų.

Be to, tyrimai rodo, kad taikant pakaitinę AAT terapiją AATD neturintiems asmenims, patirtas teigiamas poveikis transplantato prieš šeimininką ligų atvejais (46), taip pat bakterinių infekcijų sergant cistine fibroze atvejais (47) ir esant autoimuniniam 1 tipo cukriniam diabetui (48, 49).

Ikiklinikiniai tyrimai taip pat rodo AAT naudą sergant sepsiu (50), išsėtine skleroze (51), opiniu kolitu (52), reumatoidiniu artritu (53), osteoartritu (54), sistetine raudonąja vilklige (49), ūminiu miokardo infarktu bei insultu (55)

ir apskritai mažina kardiovaskulinių ligų riziką (56), taip pat svarbus išemijos-reperfuzijos pažeidimams ir komplikuotiems žaizdų gijimo procesams (57).

Neseniai buvo nustatyta sąsaja tarp AAT deficito ir sąnarių dislokacijos bei skoliozės vaikams, kuriems nustatytas Wiliamsso sindromas (WS) (58).

Mūsų tyrimo stiprybė yra problemos aktualumas, informacijos apie AATD platinimas, būtinybė geriau suprasti sutrikimo paplitimą ir genetinį pasiskirstymą. Taip pat svarbu geriau suprasti heterozigotinių (Pi^*S , Pi^*Z) ir retų mutacijų vaidmenį. Tai padės pasirinkti tinkamas ligos valdymo strategijas ir galimas ankstyvas prevencijos priemones, nes tik tiksliai ir greitai alfa-1 antitripsino diagnozė bei genotipo, lemiančio mutaciją, nustatymas padės imtis pirminių prevencinių priemonių, pavyzdžiui, mesti rūkyti, išvengti aplinkos poveikio ir žalingos profesinės aplinkos poveikio, taip pat taikyti antrinę prevenciją gydant susijusias plaučių ligas bei skiriant pakaitinę terapiją. Be to, šio darbo metu gauti duomenys papildys epidemiologinę statistiką, ypač Centrinės ir Vakarų Europos duomenų bazę (CEE A1AT *Network*), ir padės suformuluoti klausimus tolesniems tyrimams.

6. Ginamieji disertacijos teiginiai

Pi^*Z ir Pi^*S genotipų atvejais alfa-1 antitripsino koncentracija kraujo plazmoje yra sumažėjusi, tai turi įtakos ūminio švokštimo epizodo klinikiniam sunkumui.

SERPINA1 geno polimorfizmai yra atsakingi už tam tikro švokštimo sindromo fenotipo ir (ar) endotipo atsiradimą ikimokyklinio amžiaus vaikams.

SERPINA1 geno polimorfizmai yra rizikos veiksniai, kurie nulemia ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo evoliuciją į bronchų astmą paauglystėje.

Vaikams, kuriuos ikimokykliniame amžiuje vargina švokštimo sindromas, AAT genotipų variantų dažnis su Pi^*Z ir Pi^*S aleliais yra didesnis nei bendrojoje populiacijoje ir panašus į dažnį LOPL sergančių suaugusiųjų grupėje.

AAT genotipų variantai reikšmingi tiek LOPL, tiek ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo sindromo etiopatogenezeje.

LITERATŪROS APŽVALGA

7. Alfa-1 antitripsino deficito istorinės detalės

Pirmą kartą AAT stoką kraujo plazmoje ligoniams, sergantiems degeneracine plaučių liga, dėl kurios jie mirė vidutiniame amžiuje, aprašė Laurellis ir Erikssonas 1963 m. Malmo laboratorijoje pastebėjęs, kad penkių pacientų serumo baltymų elektroforezės mėginiuose nerasta alfa-1 juostos. Trims iš šių penkių pacientų buvo nustatyta anksti atsiradusi plaučių emfizema, taip pat šeiminė lėtinių plaučių ligų anamnezė. Nuo tada pradėta gilintis į AAT, nustatyta alfa-1 antitripsino struktūra, pagrindinė funkcija, biocheminiai ypatumai, reikšmė emfizemai ir lėtinei obstrukcinei plaučių ligai vystytis. Bell (1970) nurodė, kad plaučių patologijai būdinga emfizema, pirmiausia apatiniuose plaučių segmentuose. Gans ir kt. (1969) aprašė šeimyninę kepenų cirozę, kaip buvo spėjama, AAT stoką turintiems homozigotams. Gherardi (1971) aprašė AAT stoką suaugusiam ligoniui, kuris sirgo ir kepenų, ir plaučių liga.

Aagenaes ir kt. (1972) aprašė naujagimių cholestazę, kaip sunkaus AAT deficito (PiZZ genotipo) klinikinį pasireiškimą. Rastas ryšys tarp AAT deficito ir panikulito, vaskulito ir kitų ligų. Pastaruoju metu aktyviai tiriami AAT genetiniai ypatumai, kitos AAT funkcijos organizme ir pakaitinės terapijos išgrynintu AAT taikymo galimybės (59).

Lietuvos mokslininkų darbai, kuriuose buvo plėtojami AAT stokos diagnostikos metodai, ieškoma ryšio tarp AAT stokos ir įvairios patologijos išsivystymo, tiriamas AAT stokos dažnis ir genotipai lietuviškojoje populiacijoje, prasidėjo netrukus po to, kai pasirodė pirmosios publikacijos apie šią ligą užsienyje, jau 1979 metais.

AAT deficito įtaką vaikų ir suaugusiųjų sveikatai plačiai nagrinėjo V. Basys habilitacijos disertacijoje 1989 metais. Taip pat publikuoti biocheminių, eksperimentinių ir klinikinių alfa-1 antitripsino tyrimų duomenys. Tirti neišnešiotų naujagimių alfa-1 antitripsino fenotipai. V. Basys kartu su P. Kalteniu tyrė alfa-1 antitripsino deficito reikšmę vaikų kepenų ligų etiopatogenezei.

D. Stakišaitis daktaro disertacijoje nagrinėjo alfa-1 proteinazių inhibitorių reikšmę vaikams, sergantiems šlapimo organų infekcijomis, inkstų akmenlige, nefroziniu sindromu ir kitomis šlapimo organų ligomis. Publikuoti ir D. Stakišaičio, V. Basio ir kt. AAT reikšmės kardiovaskulinėms ligoms tyrimo rezultatai (60), taip pat V. Kučinsko ir bendraautorių pateikti AAT alelių pasiskirstymo duomenys Lietuvoje ištyrus per 1500 suaugusių asmenų (61).

S. Jančiauskienės plėtoti molekuliniai AAT tyrimai, disertacijoje nagrinėtas monokloninių antikūnų prieš žmogaus alfa-1 proteazių inhibitorių gavimas, charakteristika ir pritaikymas.

I. Kuliešienė ir kt., Vilniaus universiteto Vaikų ligoninėje (dabar VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos) ištyrę kepenų ir inkstų ligomis sergančius vaikus, nustatė gerokai didesnę Pi^*Z alelio dažnį. Aprašyta alfa-1 antitripsino stokos reikšmė vaikų hepatopatijoms (62).

D. Serapinas daktaro disertacijoje 2009-aisiais nagrinėjo alfa-1 antitripsino įtaką monocitų aktyvumui ir AAT genotipo įtaką sergantiesiems LOPL. Publikuoti spontaninio pneumotorakso ir AAT stokos tyrimo duomenys (63). Nustatytas AAT, kaip sisteminio uždegimo rodiklio, vaidmuo sergantiesiems lėtine obstrukcine plaučių liga (LOPL) (64). Taip pat įgyvendintas Leonardo da Vinci „Alfa-1-Qual“ projektas, kurio metu sukurta Centrinės ir Rytų Europos alfa-1 antitripsino deficito duomenų bazė, siekiant gerinti ankstyvą AAT stokos diagnostiką ir gydymą (28).

8. Alfa-1 antitripsinas, SERPINA1 genas ir alfa-1 antitripsino deficitas

8.1 . Alfa-1 antitripsinas kaip antiproteazinės sistemos dalis

Alfa-1 antitripsinas (AAT), dar vadinamas alfa-1-proteinazės inhibitoriumi (Pi), yra labiausiai paplitęs proteazės inhibitorius žmogaus plazmoje (65). Tai vienas seniausiai atrastų **serpinų** (**serino proteazių inhibitorių**), šeimos narių daugiafunkcis plazmos baltymas (66). Norint suprasti proteazių inhibitorių reikšmę, reikia kalbėti apskritai apie proteazių ir antiproteazių sistemą. Proteazių ir antiproteazių sistema dalyvauja palaikant homeostazę. Šios sistemos vaidmuo svarbus virškinimo procese, krešėjimo, uždegimo ir imuniniuose procesuose. Yra šešios proteazių grupės: serino, cisteino, treonino, aspartato, glutamino rūgšties proteazės ir metaloproteazės. Viena didžiausių grupių yra serino proteazių. Pagrindiniai serino proteazių atstovai yra: chimotripsinas, elastazė, komplemento faktorius C1s, trombinas, plazminas, tripsinas, kalikreinas III, PSA (prostatos specifinis antigenas). Proteazių nustatymas naudojamas įvairių ligų diagnostikoje, pavyzdžiui, išmatų elastazės nustatymas svarbus diagnozuojant lėtinį pankreatitą ar cistinę fibrozę, prostatos specifinio antigeno tyrimas būtinas, norint įvertinti prostatos vėžio riziką, krešėjimo faktorių vertinimas svarbus nustatant hemoragines ar trombofilines būkles.

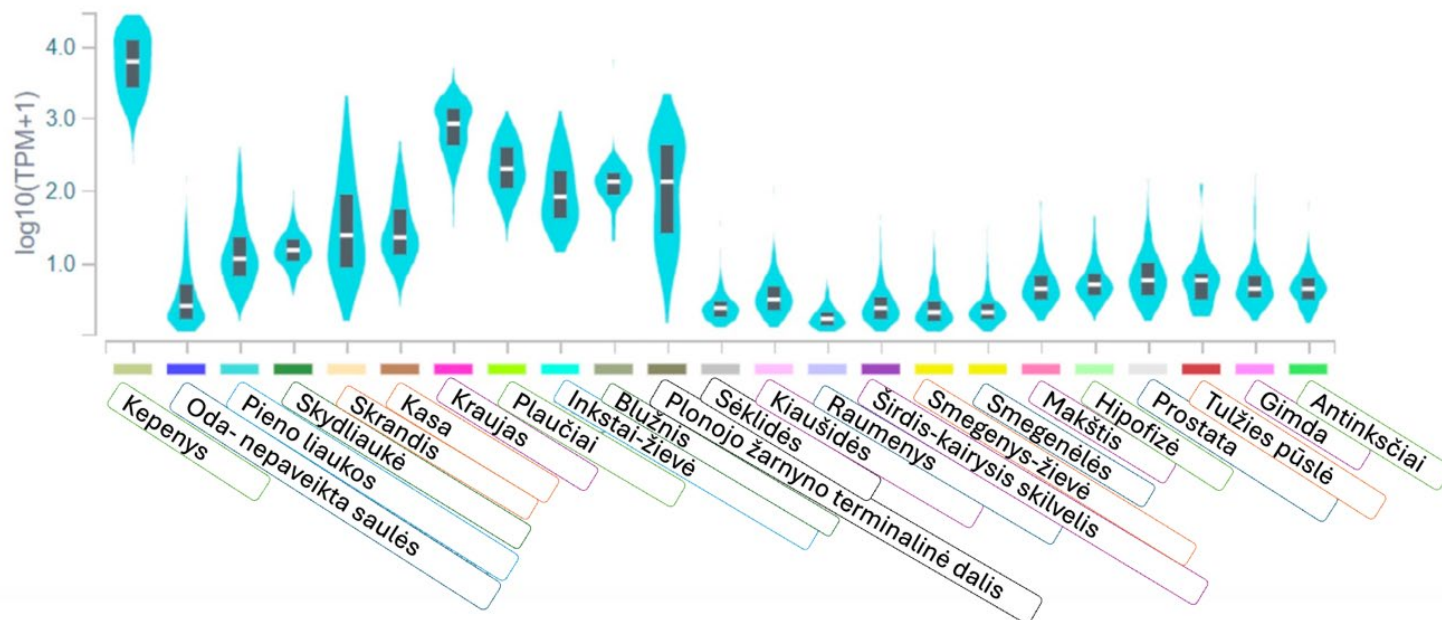
Sistema, kuri palaiko pusiausvyrą ir reguliuoja proteazių aktyvumą, yra antiproteazinė (proteazių inhibitorių) sistema. Tai įprastinės kraujo sudedamosios dalys, kurių specifinė funkcija – neutralizuoti atitinkamų

fermentų proteolitinį aktyvumą. Šioje grupėje yra ir mums svarbi natūralių serino proteazių inhibitorių šeima – serpinai. Šiuo metu gamtoje yra nustatyta daugiau kaip 1500 serpinų atstovų, iš kurių žmonių organizme aptinkami tik 37 (67) , iš jų geriausiai žinomi: alfa-1 antitripsinas, antitrombinas, komplemento C1 inhibitorius, alfa-1 antichimotripsinas, kasos tripsino inhibitorius. Dauguma minėtų antiproteazių inhibuoja keletą skirtingų proteazių, tačiau svarbiausiu poveikiu pasižymi prieš konkrečią proteazę. Pavyzdžiui, antitrombino III poveikis nukreiptas prieš trombiną, C1 inhibitoriaus – prieš komplemento faktorių C1s, kasos tripsino inhibitoriaus – prieš tripsiną, alfa-1 antichimotripsino – prieš chimotripsiną ir alfa-1 antitripsino – prieš neutrofilų išskiriamą elastazę. Šie fermentai išsiskiria uždegiminių ar infekcinių procesų metu iš aktyvuotų neutrofilų ir skaido elastiną, bazinę membraną ir kitus ekstraląstelinio matrikso komponentus. AAT taip pat yra susijęs su želatinazės B (MMP-9) slopinimu neutrofiluose (molekulėje, kuri prisideda prie neutrofilų ekstravazacijos ir kamieninių ląstelių mobilizavimo, skaidant bazinės membranos kolagenus) (68). Neutralizuodamas proteazių perteklių, AAT padeda išvengti pernelyg didelio elastino ir kolageno IV skaidymo plaučių jungiamajame audinyje (69).

Be to, kai kurie naujausi tyrimai patvirtina hipotezę, jog AAT, be to, kad turi klasikinį antineutrofilų proteazės aktyvumą, galbūt dar ir atlieka imunomoduliacines funkcijas (70). Visų pirma, sumažina naviko nekrozės faktoriaus- α (TNF- α) ir interleukino-8 (IL-8), kurie dalyvauja skirtinguose uždegimo procesuose, išsiskyrimą (29).

AAT produkcija ir ekspresija neutrofiluose ryškėja paskatinus reakciją lipopolisacharidais. AAT funkcija priklauso nuo molekulinės formos (natyvinė, latentinė, polimerinė, nutraukta, peptidinė, oksiduota, nitrozilinta, variabilus glikozilinimas) ir gali būti modifikuojama tą formą keičiant. AAT molekulės funkcija taip pat kinta jai susijungus su kitomis molekulėmis (proteazių, defensinų, citokinų, chemokinų, leukotrienų, hemo, komplemento faktorių, laisvų riebalų rūgščių, lipoproteinų, surfaktanto, pro-hepcidino, imunoglobulinų) (71).

AAT struktūriškai yra 52 kDa alfa-1 glikoproteinas, kuris susideda iš 394 aminorūgščių grandinės ir daugiausia sintetinamas hepatocituose (apie 80 % normos), o mažesniais kiekiais ir kitose ląstelėse: žarnyno Paneto, kvėpavimo takų epitelinėse ląstelėse, monocituose ir makrofaguose (72) (1 paveikslas).



1 paveikslas. Alfa - 1 antitripsino kiekis skirtinguose organuose (72).

Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms, monocitai gamina vos 1 %, o plaučių alveolių epitelinės ląstelės – 1,4 % viso AAT kiekio (73). Tai yra maždaug 200 kartų mažiau nei išskiria hepatocitai, ir yra nedidelė bendro AAT kiekio dalis, tačiau prisideda prie koncentracijos didėjimo, ypač esant uždegimui. AAT per dieną pagaminama 34 mg/kg, o fiziologinė koncentracija vaikams yra nuo 17,1 iki 46,2 mkmol/l (93–251 mg/dl), suaugusio žmogaus serume koncentracija svyruoja nuo 18,4 iki 50,2 mkmol/l (100 iki 273 mg/dl) (74). Įvairių literatūros šaltinių duomenimis, koncentracijos ribos šiek tiek skiriasi, tačiau nedaug. Didesni ir reikšmingesni svyravimai priklauso nuo AAT fenotipo. 1 lentelėje parodytas ryšys tarp alfa-1 antitripsino fenotipų, koncentracijos plazmoje ir susijusios plaučių ar kepenų ligos išsivystymo rizikos (41).

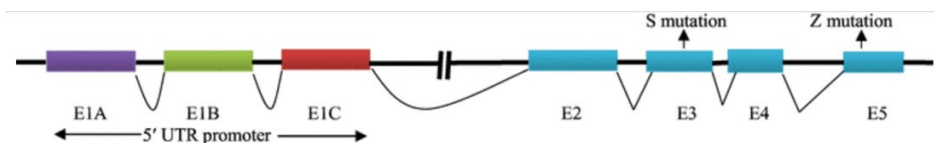
1 lentelė. Ryšys tarp alfa-1 antitripsino fenotipų, koncentracijos plazmoje ir susijusios plaučių ar kepenų ligos išsivystymo rizikos.

Fenotipas	AAT koncentracija serume ^b		Emfizemos rizika ^c	Kepenų ligų rizika ^c
	mg/dL	μM		
MM	103–200	20–39	Nepadidėjusi	Nepadidėjusi
MS	100–180	19–35	Nepadidėjusi	Nepadidėjusi
SS	70–105	14–20	Nepadidėjusi	Nepadidėjusi
MZ	66–120	13–23	Nedidelė rizika	Nedidelė rizika
SZ	45–80	9–15	Nedidelė rizika	Nedidelė rizika
ZZ	10–40	2–8	Didelė rizika	Didelė rizika
Null	0	0	Didelė rizika	Nepadidėjusi

^b Koncentracija matuota nefelometrijos metodu; ^c palyginti su bendra populiacija.

8.2. Alfa-1 antitripsino baltymą koduojantis SERPINA1 genas

Alfa-1 antitripsino baltymą koduoja SERPINA1 genas. AAT koduojantis SERPINA1 genas (anksčiau vadintas Pi – proteazės inhibitoriumi) yra 14 chromosomos ilgojo peties q31–32.1 segmente ir pasižymi dideliu genetiniu polimorfizmu (72). Jį sudaro septyni egzonai (IA, IB, IC ir II–V) ir šeši intronai (2 paveikslas) (19). IA ir IB egzonuose yra elementai, specialiai skirti makrofagų specifinei transkripcijai, o egzonas IC yra aprūpintas promotoriumi, kuris yra būtinas hepatocitų transkripcijai (75). Tame pačiame chromosomos lokuse lokalizuojasi ir kitus serpinus (antichimotripsiną-1, antitrombiną III, proteino C inhibitorių) koduojantys genai (66).



2 paveikslas. SERPINA1 geno genominė organizacija. „Egzonas I“ turi tris subregionus, žymimus E1A, E1B ir E1C. Šios trys sritys veikia kaip promotorius skirtingose ląstelėse. E2, E3, E4 ir E5 yra keturi egzonai, koduojantys alfa1 antitripsiną (AAT). M2, M1 ir M3 yra normalios polimorfinės padėtys, esančios skirtinguose egzonuose, kurios koduoja tris normalius AAT baltymo variantus (PiM1, PiM2 ir PiM3). AAT trūkumą sukeliančios taškinės mutacijos (S ir Z mutacijos) yra SERPINA1 geno E3 ir E5 egzonuose.

8.2.1. SERPINA1 geno mutacijos ir alfa-1 antitripsino gentiniai variantai

Izoelektrinio fokusavimo metodu šiuo metu yra nustatyta per 200 skirtingų alelių mutacijų (67).

M raide žymimas normalus AAT variantas (raidės M reikšmė: angl. *medium mobility* – vidutinio judrumo), o normalus fenotipas būtų žymimas PiMM. Dažniausi AAT stoką lemiantys aleliai yra Pi*S ir Pi*Z (lėtai ir labai lėtai migruojantys). Kitos svarbios genetinės mutacijos yra Pi*Null ir Pi*Pittsburgh aleliai.

Genetiniai variantai klasifikuojami į keturias bazines grupes – normalius, deficitinius, nulinius ir disfunkcinius (65). Normalūs aleliai nesukelia nei koncentracijos, nei funkcijos pakitimų. Dažniausiai pasitaikantys AAT aleliai yra M variantai, kuriuose AAT koncentracija normali. Dėl deficitinių alelių AAT koncentracija paprastai yra gerokai mažesnė ir būna mažiau nei 20 mmol/l, o tai sumažina ir AAT funkcinį aktyvumą. Deficitiniai aleliai dažniausiai sukelia plaučių ar kepenų ligas, o turintys nulinius alelius yra susiję tik su plaučių ligomis (65). Disfunkcinių alelių atvejais (pvz., Fand Pittsburgh aleliai) AAT koncentracija būna normali, tačiau yra sutrikusi baltymo funkcija. Antroje lentelėje išvardyti kai kurie įprasti AAT alelių variantai. Pastaruoju metu yra prieinami mėginiai, kuriais tiriami 14 deficitinių alelių (76).

2 lentelė. Dažniausiai pasitaikantys normalūs ir mutacijas lemiantys aleliai.

		Egzonas	Komentaras
	M1 (Ala213)	III	Dažniausi M aleliai
	M1 (Val213)	III	
	M2	II	

		Egzonas	Komentaras
Normalūs aleliai	M3	V	
	M4	II	
	M5	II	2 aleliai: M5 _{berlin} ir M5 _{karlsruhe}
	M6	II	
	L	II, III, V	2 aleliai: L _{frankfurt} ir L _{offenbach}
	V	II, V	3 aleliai: V, V _{donauworth} ir V _{munich}
	X	III, V	2 aleliai: X ir X _{christchurch}
	B	Nežinomas	B _{alhambra}
	P	III, V	2 aleliai: P _{st. louis} ir P _{albans}
Deficitiniai aleliai	Z	V	Dažniausias sunkaus deficito alelis
	S	III	Mažesni deficito laipsniai nei Z alelio, bet dažnesni
	M aleliai	II,V	M _{heerlen} , M _{malton} , M _{mineral springs} , M _{procida} , M _{bethesda} , M _{palermo} ir M _{nichinan}
	W	V	
	I	II	Beveik normali serumo koncentracija
	P	III	2 aleliai: P _{lowell} ir P _{duarte}
Disfunkciniai aleliai	F	III	Maža ir normali serumo koncentracija kai baltymai disfunkciniai
	Pittsburg	V	
Nuliniai aleliai	Q0LaPalma	II	AAT koncentracija neišmatuojama arba labai maža
	Q0Lisbon	II	rs1490133295, koncentracija labai maža
	Q0Devon	II	rs11558261, p.Gly115Ser, koncentracija labai maža
	Q0Newport	II	
	Q0Porto	Intronas 1C	c.-5 + 1G > A, koncentracija neišmatuojama arba labai maža
	Q0Madrid	Intronas 1C	c.-5 + 2dubT, koncentracija labai maža
	Q0Faro	II	M1Val, koncentracija maža

AAT genetinių variantų mutacijas dažniausiai lemia pavienių aminorūgščių pasikeitimai, pavyzdžiui, PI*Z alelis sąlygoja Glu³⁴² → Lys, PI*S – Glu²⁶⁴ → Val, PI*Null – Try¹⁶⁰ iškrita, PI*Pittsburgh – Met³⁵⁸ → Arg. Dauguma AAT variantų nesukelia nei funkcijos, nei kiekio pokyčių (77).

AAT Pi*Z alelio mutacija lemia baltymo pakitimą: sutrinka ryšys tarp reaktyviojo centro kilpos ir beta vijos A, dėl to vienos AAT molekulės reaktyvusis centras įsiterpia į kitos AAT molekulės beta viją A, taip suformuojamas dimeras, kuris gali formuoti polimerų grandines. Kai reaktyvusis AAT molekulės centras yra susijungęs su kita AAT molekule, jis negali jungtis su proteaze. Pi*S ir Pi*Z alelių koduojami baltymai suformuoja polimerus kepenyse, kurie yra kaupiami hepatocitų endoplazminiame tinkle. Minėti intraląsteliniai AAT polimerai sąlygoja hepatitus vaikų amžiuje ir didina kepenų vėžio riziką vyresniame amžiuje (66). Pi*S baltymo variantas kur kas mažiau linkęs formuoti polimerus, palyginti su Pi*Z variantu, tai sąlygoja mažesnę kaupimąsi endoplazminiame tinkle ir kartu mažesnę AAT trūkumą serume (78).

Penki reti aleliai MMalton, MPalermo, MNichinan, Q0LaPalma ir SIIyama yra susiję dėl jų gretimų 51–53 aminorūgščių liekanų pokyčių, kur Phe-Phe-Ser aminorūgščių seka yra esminė norint išlaikyti stabilią srities konformaciją. Fenilalanino delecija – p.Phe52del (rs775982338), aptinkama MMalton, MPalermo arba MNichinan variantuose, o serino aminorūgšties pakeitimas fenilalaninu p.Ser53Phe (rs55819880) aptinkamas SIIyama mutacijos atvejais. Šios mutacijos, panašiai kaip Pi*Z alelio atvejais, padidina polimerizacijos procesą ir polimerų kaupimąsi hepatocituose (72). SIIyama alelis yra labai retas, nustatytas vos keliuose šeimose iš Japonijos, kiti aleliai, kuriems būdinga delecija p.Phe52del, yra nustatyti keliems asmenims iš Europos ir Šiaurės Afrikos, ir, kaip rodo kontrolinių populiacijų genomikos tyrimai, randami retai arba labai retai (< 0,01–0,04 %).

Kaip minėta pirmiau, alfa-1 antitripsino deficito Pi*Z, MMalton, SIIyama aleliai yra susiję su pakitusių baltymų – polimerų kaupimu kepenyse. Pi*Z alelis gali būti nustatomas izoelektrinio fokusavimo (IEF) metodu, o Mmalton ir SIIyama, taikant šį metodą, gali būti praleisti, nenustatyti arba neteisingai diagnozuoti, ypač kai yra Mmalton alelis, nes IEF lauke jis panašus į M2 potipį. Todėl, norint juos nustatyti, būtina atlikti molekulinę analizę (79).

Iki šiol tik keliuose tyrimuose atliktas klinikinis MMalton įvertinimas, rodantis ryšį su plaučių ir kepenų ligomis. Nustatytas M3MMalton genotipas, rodantis didelį p.Phe52del varianto patogeniškumą ir heteropolimerizacijos potencialą (80). Taip pat AATD turintiems pacientams kepenyse rasta MMaltono mineralizuotų granulių, kurios turi kalcio, o tai gali daryti įtaką Mmalton alelio sąlygotos ligos patogenezei, kuri skiriasi nuo Pi*Z ir SIIyama alelių. Buvo iškelta hipotezė, kad šie pakitimai skatina ląstelių nekrozę. Yra žinoma, kad kalcis yra pagrindinis ląstelių nekrozės veiksnys dėl padidėjusios intraląstelinės jo koncentracijos (79).

Yra mažiausiai 10 kitų retų alelių variantų, turinčių polimerogeninių savybių, jei kalbama apie jų ryšį su kepenų liga. Iš jų I (p.Arg39Cys; rs28931570) ir MWurzburg (p.Pro369Ser; rs61761869) aleliai yra labiausiai paplitę iš labai mažo dažnio variantų Europoje (atitinkamai 0,2–0,05 %) (81).

Svarbu tai, kad, mūsų žiniomis, tik I ir MWurzburg alelių polimerogeninės savybės yra kruopščiai ir eksperimentiškai patvirtintos (82). Yra žinoma, kad I variantas yra funkcinis S alelio atitikmuo. Be to, I ir MWurzburg aminorūgščių sekos pakitimai taip pat gali prisidėti prie polimerų kaupimosi padidindami AAT hidrofilumą, nors ir mažesniu mastu nei Pi*Z ar Mmalton atvejais, atsižvelgiant į tai, kad jų ryšys su kepenų liga priklauso nuo stipresnio polimerogeninio aktyvumo. Nors mažas šių alelių paplitimas gali trukdyti tiksliai įvertinti jų poveikį AATD klinikinei reikšmei, jų aptikimas tarp simptominių atvejų rodo tam tikros sąsajos su kepenų ir plaučių ligų rizika tendenciją (83).

Geriausias disfunkcinio alelio pavyzdys yra Pittsburgh, kuriam būdingas p.Met358Arg aminorūgščių sekos pasikeitimas (rs121912713). Šis pokytis AAT proteazės afinitetą nukreipia link trombino, o ne į įprastą antielastazę slopinantį aktyvumą. Įdomu, kad klinikiniai rezultatai, susiję su Pittsburgh variantu, nėra susiję su AAT funkcijos praradimu, o susiję su sutrikusia krešėjimo kaskadų kontrole. Iš tiesų, ši mutacija pirmą kartą buvo aprašyta jaunam berniukui, kuris mirė dėl nukraujavimo. Šis alelis yra labai retas ir buvo pranešta vos apie kelis pavienius atvejus ir vienoje šeimoje, kur mutacija atsirado kaip *de novo* (84).

Pi*F alelis yra dar vienas gerai žinomas disfunkcinio varianto pavyzdys. Šiuo atveju, lyginant su normaliu Pi*M aleliu, Pi*F variantas pasižymi kur kas mažesniu neutrofilų elastazės ir proteinazės 3 slopinimu. Šis disfunkcinis alelio variantas atsiranda dėl p.Arg223Cys (rs28929470) a.r. sekos pasikeitimo. Manoma, kad šis alelis didina emfizemos riziką, tačiau tai gali būti taikoma tik PiFZ heterozigotams, nes PiFF pacientui, kurio genotipas homozigotinis, nebuvo aptikta elastazės sukkelto plaučių pažeidimo požymių (85). Svarbu tai, kad PiFF pacientams kvėpavimo takų pažeidimas išsivysto ne dėl mažesnės AAT koncentracijos, nes sekrecija yra nesutrikusi. Pi*F alelis yra palyginti retas variantas, aptinkamas daugiausia tarp europiečių, ir didžiausias jo dažnis yra Švedijoje – 0,9 % (72). Atsižvelgiant į tai, kad AATD įvairių atvejų klinikinė ligos išraiška skiriasi, papildomų pacientų tyrimas būtų labai svarbus siekiant išsiaiškinti, ar PiFF pacientams yra padidėjusi rizika sirgti plaučių ligomis, ar ne. Yra pranešimų apie papildomus disfunkcinius variantus, tačiau jų retumas neleidžia išsamiau tirti ir įvertinti jų ryšio su AATD liga (86).

Nuliniai variantai lemia, kad AAT plazmoje neaptinkama, todėl jie žymimi Q0, o ne Pi. Koduojančioje srityje iškritimas, įsiterpimas arba bazės (-ių) pasikeitimas lemia Q0 genotipą, todėl atsiranda ankstyvas stop kodonas ir nestabili mRNA. Asmenų, turinčių nulinį fenotipą, yra mažiausia ir jie serga sunkiausia ligos forma. Jų rasta visose populiacijose, tačiau itin retai. Apskaičiuota, kad tarp baltaodžių nulinį variantų dažnis yra mažesnis nei 0,1 % (87).

Q0Lisbon (p.Thr68Ile; rs1490133295) nulinis alelis yra pavyzdys, kai gaminamas visas baltymas, bet ląstelėje jis neaptinkamas kaip granulės ir prastai išskiriamas iš ląstelių, taigi serume yra neišmatuojamas, dėl to vadinamas nuliniu variantu (88). Tai, kartu su Mheerlen deficitiniu aleliu, tikėtina, yra labiausiai paplitęs nulinis alelis europiečių ir „tikrųjų“ amerikiečių populiacijose (atitinkamai apie 0,01 % ir 0,02 %). Pietų Azijos gyventojams panaši situacija yra su p.Gly115Ser (rs11558261) a.r. sekos pasikeitimu, kuris apibrėžia Q0Devon ir Q0Newport nulinius alelių variantus (0,07 %) (72).

Sujungimo vietos pakeitimas yra dar viena nulinį alelių priežastis. Įdomu, kad kai kurie iš nedaugelio literatūroje aprašytų atvejų yra susiję su SERPINA1 ekspresijos pažeidimu, apsiribojančiu tik hepatocitais. Q0Porto (rs775786225), Q0Faro ir Q0Madrido aleliai priklauso šiai susijungimo vietos mutacijų kategorijai.

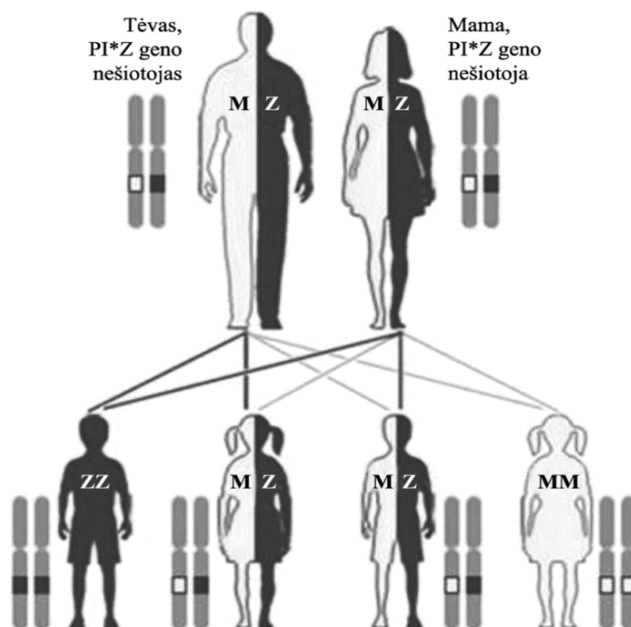
Kad ir kokie būtų pagrindinių nulinį alelių molekuliniai mechanizmai, jie pagal nutylėjimą yra kliniškai susiję su funkcijos praradimu, o vėliau ir su AATD plaučių pažeidimu. Čia svarbu pabrėžti, kad jie yra griežtai susiję su neutrofilų elastazės ir kitų proteazių neslopinamu aktyvumu.

8.3. Alfa-1 antitripsino deficitas

Taigi AAT deficitas – tai būklė, kai plazmoje esančio AAT koncentracija nepakankama arba yra sutrikusi baltymo funkcija. Jei AAT koncentracija serume didesnė negu 20 $\mu\text{mol/L}$, mažai tikėtina, kad pacientas turės kliniškai reikšmingą AAT trūkumą. Tačiau pacientai, kurių AAT koncentracija serume yra mažesnė nei 18,4 $\mu\text{mol/L}$ (100 mg/dL), turėtų būti toliau tiriami atliekant izoelektrinį fokusavimą arba genotipavimą. PiZZ genotipas lemia labai mažą AAT koncentraciją serume (tik 10–15 % nuo normos), o PiSZ, PiSS ir PiMZ genotipai – mažą ir vidutinę AAT koncentraciją serume – nuo 35 % iki 70 % nuo normos (89). AAT, kaip ūmios fazės reagento, koncentracija plazmoje greitai padidėja (3–4 kartus) reaguojant į uždegimą ar infekciją, o audiniuose AAT koncentracija padidėja iki 11 kartų uždegiminio atsako metu (90).

AAT deficitas yra reta autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga (ORPHA:60). Jeigu abu tėvai yra Pi*Z alelio nešiotojai, t. y. heterozigotai

(moteris – PiMZ, o vyras – PiMZ), tikimybė, kad kūdikis gims turėdamas PiZZ homozigotinę geną, bus 1 iš 4 (3 paveikslas).



3 paveikslas. Alfa-1 antitripsino deficito (PiZZ) paveldėjimo schema. Manoma, kad Pi*Z ir Pi*S aleliai lemia daugiausia AAT stoką sąlygojančių ligų, įskaitant LOPL, kepenų ligas (lėtinį hepatitą, kepenų cirozę, hepatoceliulinę karcinomą), kartais vaskulitą, nekrozinį panikulitą ar kitas lėtinio uždegimo sukeltas ligas (91, 92).

9. Alpha-1 antitripsino deficito diagnostikos galimybės

Šiuo metu yra ne vienas AATD nustatymo algoritmas. Nors šie algoritmai šiek tiek skiriasi, dauguma jų remiasi AAT koncentracijos periferiniame kraujyje nustatymu (93). Įdomu, kad AAT nustatymas periferiniame kraujyje turi tam tikrų techninių ypatumų, kurie yra svarbūs norint tinkamai interpretuoti rezultatus. Tačiau daugelis tyrėjų į šiuos skirtumus neatsižvelgia ir paprastai manoma, kad AAT koncentracijos kraujyje nustatymas yra vienodai teisingas, kad ir koks laboratorinis metodas būtų taikomas (94).

Diagnostikos gairėse pirmenybė teikiama nefelometrijai ir turbidimetrijai (95).

9.1. Alpha-1 antitripsino koncentracijos nustatymas nefelometrijos metodu

Nefelometrija – tai žmogaus baltymų biologiniuose skysčiuose, tokiuose kaip kraujo plazma, serumas, smegenų skystis, šlapimas, kiekybinis nustatymas. Turbidimetrija ir nefelometrija – tai optinės analizės metodai, kuriais matuojama labai smulkių dalelių koncentracija skysčiuose. Jis pagrįstas antikūnų ir antigenų netirpių kompleksų, kurie nusėda ir išsklaido šviesos intensyvumą, kai permėginį pereina stiprus šviesos pluoštas, susidarymu. Nefelometras matuoja išsklaidytą šviesą, kuri yra proporcinga antigeno kiekiui. Galima naudoti kraujo serumo arba plazmos mėginius, tačiau tikrai svarbu vengti hemolizės, lipemijos ar užšaldymo-atšildymo ciklų, nes šie procesai turi įtakos drumstumui ir gali turėti įtakos rezultatams (96).

Jei imami sauso kraujo lašo mėginiai, svarbu apskaičiuoti teorinį kraujo praskiedimą. Kad būtų galima atlikti tyrimą, kraujo serumas ir plazma paprastai skiedžiami maždaug 1:20, o kraujas, išskirtas iš sauso kraujo lašo mėginio kortelės (Alfa-Kit), gali būti skiedžiamas iki 1:64 (97). Mėginiai ir standartiniai praskiesti sumaišomi su polikloniniu žmogaus AAT antikūno tirpalu ir AAT koncentracija matuojama nefelometru. Tada, atsižvelgiant į atliktą praskiedimą, nubraižoma standartinė kreivė, pagal kurią ekstrapoliuojamos mėginio koncentracijos vertės (98).

9.2. Alpha-1 antitripsino koncentracijos nustatymas turbidimetrijos metodu

Turbidimetrija veikia tuo pačiu fizikiniu principu kaip ir nefelometrija, tačiau šiuo atveju matuojamas praleistos šviesos intensyvumo (absorbcijos) sumažėjimas, kurį sukelia antikūnų ir antigenų kompleksų sukelta sklaida. Taigi šviesos kiekis, praleistas be sklaidos, yra atvirkščiai proporcingas mėginyje esančiam AAT kiekiui (99).

AAT koncentraciją galima matuoti serume arba plazmoje, tačiau sauso kraujo lašo mėginiams rekomenduojama taikyti nefelometriją, o ne turbidimetriją, nes ji yra tinkamesnė mažos koncentracijos nustatymui (97).

9.3. Alpha-1 antitripsino fenotipavimas ir genotipavimas

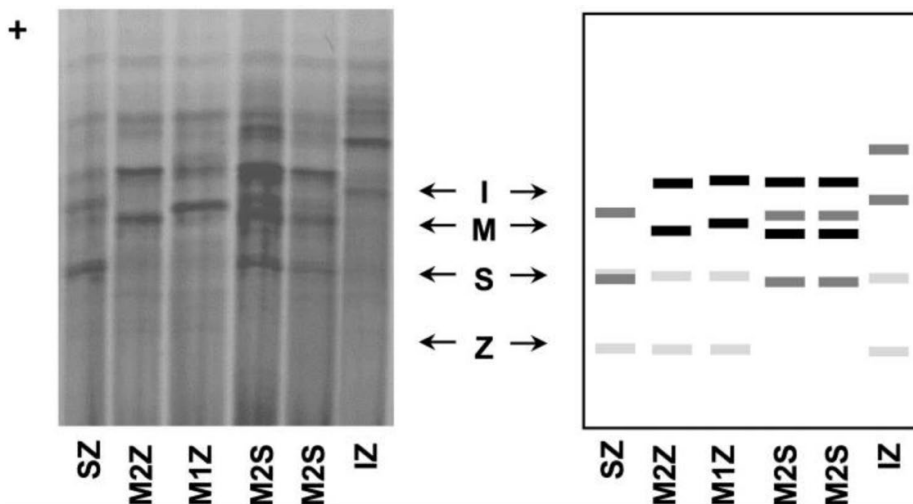
Kiekybinio AAT koncentracijos serume nustatymo AAT deficitui diagnozuoti nepakanka, nes AAT yra ūmios fazės reagentas, kurio kiekis gali padidėti dėl uždegimo, todėl diagnozė gali būti klaidinga. Todėl būtina taikyti kitus metodus, tokius kaip fenotipavimas ir genotipavimas.

Kaip minėta, AATD daugiau kaip prieš 50 metų atrado Laurellis ir Erikssonas, kai pastebėjo, kad pacientams, sergantiems plaučių emfizema,

kraujo plazmos mėginių elektroforezės juostelėse nėra AAT atitinkančios baltymo juostelės (100). Vėliau buvo sukurtos kitos elektroforezės sistemos, kurių juostų skiriamoji geba buvo geresnė, ir jos buvo naudojamos norint nustatyti baltymus kraujyje, įskaitant AAT. Šių baltymų aleliai buvo žymimi kaip F (greiti) ir S (lėti) pagal jų elektroforetinį judrumą krakmolo, agarozės ar poliakrilamido geliuose (72). Tyrimo principas remiasi krūvį turinčių molekulių (baltymo), judėjimu elektriniame lauke, kurio pH gradientas 4–5. Elektroforezinis baltymų judrumas priklauso nuo molekulės krūvio, masės ir formos. Izoelektriniame taške baltymų molekulės yra nejudrios, nes neturi krūvio. Kai terpės pH didesnis už izoelektrinį tašką, baltymai įgauna neigiamą krūvį ir juda link anodo, o kai mažesnis – įgauna teigiamą krūvį ir juda link katodo. Kuo terpės pH yra labiau nutolęs nuo izoelektrinio taško, tuo baltymai judresni elektriniame lauke. Elektriniame lauke kraujo serumo baltymų mišinys išsiskirsto į frakcijas, nes, kai yra tam tikras pH, įvairūs baltymai skirtingu greičiu juda anodo arba katodo link. Čia aleliai klasifikuojami nuo A iki Z, t. y. A yra greitesni (arčiau anodo – teigiamo IEF gelio galo), M – esantys vidurinėje srityje, o Z – lėčiausiai migruojantys aleliai (4 paveikslas) (101).

Bendrai yra septyni vyraujantys baltymo aleliai: M1 (M1Ala arba M1Val), M2, M3, M4, S ir Z. M1–M4 laikomi normaliais aleliais, esančiais centrinėje IEF gelių dalyje, o S ir Z yra trūkumo aleliai, susiję su silpnesnėmis juostomis, esančiomis arčiau katodo (4 paveikslas).

Taigi, kalbant apie alfa-1 antitripsino fenotipą, kitaip nei yra įprasta, šis terminas reiškia ne klinikinius ligos ar ligonio išskirtinius išorinius požymius, o baltymo judėjimą, tiksliau, judėjimo greitį elektriniame lauke, išsiskirstymą į atitinkamas frakcijas, ir pagal tai yra nustatomas ne žmogaus, o baltymo fenotipas.



4 paveikslas. AAT fenotipai, gauti atlikus IEF poliakrilamidiniuose geliuose (kairėje pusėje), ir pagrindinių AAT alelių diagnostinių juostų scheminis pavaizdavimas (dešinėje pusėje) (72).

Kitas terminologijos ypatumas yra susijęs su „Q0“ vartojimu nuliniams aleliams žymėti: tai variantai, kai IEF geliuose negalima aptikti jokios juostos. Be to, šioje nomenklatūroje galima naudoti ir susietą miesto pavadinimą, kad būtų galima atskirti alelius, pasižyminčius panašiu elektroforeziniu judrumu, bet turinčius skirtingų mutacijų (pvz., MMalton, ZAugsburg arba Q0Ourém). Tai dažniau taikoma klasifikuojant retus variantus, kai miesto pavadinimas atitinka pirmojo nustatytos mutacijos nešiootojo gimimo vietą (102).

Nors fenotipavimas leidžia nustatyti daugybę skirtingų alelių (įprastų ir retų), šis metodas reikalauja daug laiko, o rezultatams interpretuoti reikia didelių techninių galimybių, įgūdžių ir patirties. Be to, fenotipavimo būdu sudėtinga nustatyti Pi nulinius alelius, nes nėra cirkuliuojančio baltymo ir reikia specialių laboratorinių procedūrų. Be to, dažnai fenotipavimo klaidų atsiranda dėl prastos mėginio kokybės. SERPINA1 geno genotipo nustatymas leidžia atskleisti dažniausiai pasitaikančius Pi*Z ir Pi*S alelius. Nors genotipuojant galima praleisti 1 iš daugiau kaip 30 retų alelių, dėl kurių sumažėja AAT kiekis, tačiau šį genotipo nustatymo metodą svarbu įtraukti į AAT deficito diagnozavimo algoritmus, nes jis sumažina brangiai kainuojančių IEF arba sekos nustatymo (sekvenavimo) tyrimų poreikį (103). Taigi fenotipų nustatymas, naudojant izoelektrinę fokusavimą, leidžia aptikti mutaciją, nustatyti ją lemiantį alelį ir patikrinti brolius ir seseris ar kitus šeimos narius, kurie tuo metu gali būti besimptomiai. AAT genotipo analizė siūloma kaip priedas prie fenotipų nustatymo, nes yra galimybė greitai

patikrinti, ar yra Pi*Z ir Pi*S alelių, nustatyti mutacijų homozigotiškumą arba heterozigotiškumą. Gtnotipavimas Taip pat padeda nustatyti nulinius ir retus alelius, tyrimas palyginti nebrangus (išskyrus sekos nustatymą). Neabejotinai yra nustatomos specifinės mutacijos, genotipavimas taip pat tinka pacientams, kuriems jau taikoma pakaitinė terapija (104). Egzoninės DNR sekos nustatymas, kitaip sekvenavimas, atliekamas tais atvejais, kai turimais metodais nepavyksta nustatyti tikslios diagnozės, tikslaus genotipo.

10. Epidemiologija

Nustatyta, kad Pi*Z alelis atsirado Šiaurės Europoje apytikriai prieš 6000 metų (105), o Pi*S – prieš 6000–9000 metų (300–450 kartų) pietvakarinėje Europos dalyje, Iberijos pusiasalio regione (66). Nuo to laiko abu aleliai buvo aptinkami visose pagrindinėse rasinėse grupėse.

Įvairiais metodais apskaičiuotas ligos dažnumas kiek skiriasi. Vienų tyrimų duomenimis, AATD dažnis yra maždaug 1 iš 1600 naujagimių. Šiaurės Amerikos tyrimų duomenimis, ligos dažnumas yra 1 iš 2800–5000 naujagimių (106). Europoje, ypač Skandinavijoje ir Baltijos šalyse, nustatytas gana didelis Pi*Z ir Pi*S genų paplitimas ir svyravimas įvairiose šalyse – jų dažnis yra atitinkamai 1–3 % ir 5–10 % (107).

Epidemiologinių tyrimų duomenimis (108, 109), Baltijos šalių regionas ir konkrečiai Lietuva išsiskiria kaip šalis, kurioje AATD įtaką darančių Pi*Z ir Pi*S genotipų paplitimas yra gana didelis (jo dažnis svyruoja nuo 11 iki 16 alelių tūkstančiui alelių), palyginti su kitomis Vakarų Europos ar juo labiau Amerikos, Australijos žemynų šalimis. Manoma, kad tai susiję su vikingų invazija į šias šalis.

Nors kai kurie autoriai siūlo įvairių Pi*Z mutacijos kilmės teorijų, labai tikėtina, kad mutacija įvyko Švedijoje ir išplito į Europos žemyną jūrų ir vidaus vandenų keliais per Baltijos šalis. Pi*Z mutacija atsirado palyginti neseniai tarp Šiaurės Europoje gyvenančių baltosios rasės žmonių, gyvenusių maždaug prieš 2000 metų, arba 66 kartas. Vėlesniais šimtmečiais emigrantai iš Europos platino geną ne Europos šalyse, į kurias jie emigravo. Įdomu, kad atliekant epidemiologinį tyrimą sukurtų Pi*Z pasiskirstymo žemėlapių duomenys sutampa su šia hipoteze (108).

Nedidelis PiZZ genotipo dažnumas bendrojoje populiacijoje apsunkina tikslų duomenų surinkimą. Patikslinti naujagimių sergamumą šia liga padėjo kai kuriose šalyse vykdoma visuotinė naujagimių patikra. Švedijoje tokia patikra vyko 1972–1974 m. Iš 200 tūkst. tirtų naujagimių tik 120 turėjo PiZZ genotipą (110). Tai vienas didžiausių tokio pobūdžio tyrimų. „Tokie tyrimai, kaip šis, yra informatyvūs, tačiau gali būti pernelyg brangūs, todėl visos

populiacijos atranka buvo taikoma ribotai“, – rašė autorius. Ekonominis veiksnys yra pagrindinė priežastis, kodėl neatliekama daugiau atrankinių tyrimų net ir dėl kitų ligų. Be to, visos populiacijos atranka turi savo trūkumų, pavyzdžiui, galimą diskriminaciją dėl lyties ir daromą neigiamą psichologinį poveikį, pavyzdžiui, gauti informaciją, kurios neieškojo ir nesitikėjo, stresas laukiant rezultatų, neapibrėžtos prognozės ar ribotos gydymo ir profilaktikos galimybės.

Visuotinės patikros metodu gaunami tiesioginiai AAT alelių dažnio tiriamoje populiacijoje duomenys, tačiau visuotinės naujagimių patikros ir kitų plačių epidemiologinių tyrimų pagrindiniai trūkumai yra dideli mastai, dėl to kylantys logistikos sunkumai ir taip pat didelės išlaidos.

Tikslingesni yra mažesnio masto šių alelių paplitimo tyrimai tikslinėse grupėse, kai taikomos specialios programos, tiriami kraujo donorai arba, pavyzdžiui, tiriamas AAT tarp sergančiųjų LOPL ar kitomis kvėpavimo takų ligomis. Vykdam tikslinių grupių analizės programą, Turkijoje ištyrus 169 sergančiuosius LOPL, nustatytas vos 1 PiZZ atvejis, t. y. PiZZ dažnis tarp sergančiųjų LOPL – 0,51 %, ir vyravo reti genotipai, kurie sudarė 4,6 % (111). Ispanijoje, La Palmos saloje, buvo ištirti 1493 plaučių ligomis sergantys pacientai, neatsižvelgiant į kvėpavimo takų simptomus, ir 465 naujagimiai. Sergančiųjų grupėje homozigotinis PiZZ genotipo dažnis buvo tik 1,2 %, tačiau tai buvo 5 iš 7 LOPL sergančiųjų, o tai yra 71,4 %. Heterozigotinių genotipų PiMZ ir PiSZ dažnis buvo didesnis bronchine astma (6,3 % ir 1,9 %) ir bronchų hiperreaktyvumu (5,1 % ir 2,1 %) sergančiųjų grupėse nei LOPL (4,6 % ir 0,5 %) (107). Tokį didelį AAT stokos dažnį galėjo lemti ir tiriamųjų kontingentas, nes į tyrimą įtraukti tik sergantieji plaučių ligomis, kuriems ir kliniškai buvo galima įtarti AAT stoką. Danijos LOPL ligonių grupėje PiZZ AAT deficito dažnis buvo 0,8 % (112).

Specialios patikros būdu nustatoma daugiau AATD atvejų nei vien įtarus kliniškai. Tokių tyrimų tikslas – nustatyti didesnės rizikos atvejus ir kuo anksčiau pradėti taikyti prevencines priemones.

11. Alfa-1 antitripsino deficito klinikinė reikšmė

Asmenims, turintiems alfa-1 antitripsino trūkumą, būdinga įvairi simptomatika ir klinikinė ligos išraiška labai varijuoja – nuo besimptomio varianto iki progresuojančio organų nepakankamumo, reikalaujančio net transplantacijos (113, 114).

Kvėpavimo takų pažeidimas sergant AATD gali pasireikšti kaip bronchų astma, lėtinis bronchitas arba bronhektazė (115). Genetiškai nustatytas AAT

trūkumas taip pat yra susijęs su emfizema, ypač asmenims, kurie rūko arba yra veikiami kitų įkvėpiamų dalelių ir (arba) garų (116).

Klasikinė AAT stoka siejama su didesne emfizemos ir LOPL atsiradimo rizika suaugusiems žmonėms ir kepenų ligomis tiek suaugusiems, tiek vaikams (17). Tai pagrindinis šiuo metu nustatytas genetiškai paveldimas LOPL ir emfizemos rizikos veiksnys (117).

Asmenims, turintiems alfa-1 antitripsino trūkumą, plaučių pažeidimo patofiziologija lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL) atveju pirmiausia siejama su proteazių ir antiproteazių disbalansu plaučiuose (118).

Paprastai AAT slopina neutrofilų elastazės aktyvumą – proteazę, kurią uždegimo metu išskiria imuninės ląstelės, kad suardytų pažeistus audinius. Esant AAT trūkumui, proteazės aktyvumas nekontroliuojamas. Dėl to sunaikinamas plaučių audinys, ypač alveolės, o tai sukelia LOPL būdingą emfizemą ir obstrukciją (19).

Nuolatinis proteazės ir antiproteazės disbalansas palaiko uždegiminį procesą, tęsiasi audinių pažeidimas ir būna sutrikęs atkūrimo mechanizmas. Be to, jautrumas aplinkos veiksniams, tokiems kaip cigarečių dūmai, dar labiau padidina šių asmenų plaučių pažeidimo progresavimą (119).

Kaip minėta pirmiau, AATD yra išskirtinė būklė tuo, kad tai yra proteinopatija, kuri skirtingais mechanizmais veikia ne tik plaučius, bet ir kepenis (87).

AATD yra pagrindinė genetinė vaikų kepenų ligų priežastis. Kepenų ligos vystymosi mechanizmas dėl AATD yra baltymų struktūrinis pakitimas, susijęs su toksiniu poveikiu hepatocitams (120). Hepatocituose formuojasi polimerai, kurie kaupiasi endoplazminiame ląstelės tinkle ir sukelia lėtinį uždegimą, o tai sąlygoja kepenų fibrozę, cirozę ir didesnę kepenų ląstelių karcinomos riziką. Šiuo atveju hepatocitai sekretuoja labai nedidelį AAT kiekį, ir net iki 85 % susintetinto AAT lieka ląstelėse (120).

Kepenų pažeidimas pasireiškia apie 10–15 % PiZZ genotipą turinčių asmenų, o ir šioje grupėje būdinga klinikinė bei patologinė įvairovė – nuo besimptomio kepenų fermentų padaugėjimo iki visiško, galutinės stadijos kepenų nepakankamumo (121).

Yra atliktas ne vienas tyrimas, kuris daugiausia nagrinėjo prieš uždegiminį AAT poveikį organizmui: Zhu su bendraautorais (122) nustatė, kad AAT turi apsauginį poveikį dirbtinės plaučių ventiliacijos sukeltos plaučių pažeidimo išsivystymui. Žiurkėms, gydomoms didelio kvėpuojamojo tūrio ventiliacija, buvo matuojamas citokinų kiekis BAL skystyje ir pastebėta, kad prieš uždegiminių citokinų (TNF- α , IL-1 β ir IL-6) buvo kur kas mažiau, kai žiurkėms į veną buvo leidžiamas AAT, o prieš uždegiminio IL-10 lygis buvo labai pakilęs. Todėl autoriai padarė išvadą, kad AAT gali sumažinti

ventiliacijos sukeltą plaučių pažeidimą, slopindamas uždegiminių mediatorių gamybą, ir teigia, kad AAT skyrimas gali būti intervencinis metodas ūminiu respiraciniu distreso sindromu (ŪRDS) sergantiems pacientams, kuriems reikalinga mechaninė ventiliacija.

Apsauginio AAT vaidmens bronchų uždegimui hipotezę patvirtina ir kiti du tyrimai, vienas atliktas su pelėmis (123), o kitas su žmonėmis (124). Pirmasis nustatė, kad AAT+/+ transgeninėms pelėms, kurios išskiria žmogaus AAT plaučiuose, mirtingumas nuo *Pseudomonas aeruginosa* sukeltos pneumonijos sumažėjo 90 %, palyginti su netransgeniniais kontroliniais gyvūnais. Be to, netransgeninėms pelėms papildomas egzogeninio žmogaus AAT paskyrimas taip pat reikšmingai sumažino mirštamumą nuo *P. aeruginosa* pneumonijos. *P. aeruginosa* infekuotoms AAT+/+ pelėms, palyginti su infekuotomis netransgeninėmis pelėmis, sumažėjo plaučių audinio pažeidimas, sumažėjo bakterijų koncentracija plaučiuose ir kraujyje ir sumažėjo cirkuliuojančių citokinų koncentracija. Antrasis tyrimas rodo, kad tarp tiriamųjų, kuriems nustatytas humoralinis imunodeficitas ir reikalinga pakaitinė terapija gama-globulinu, bronhektaze sergančių pacientų vidutinė AAT koncentracija buvo mažesnė nei tiems, kuriems bronhektazės nebuvo, taigi daroma išvada, kad AAT trūkumas gali paskatinti bronhektazės vystymąsi (124).

Kitas įdomus atradimas pateiktas, atlikus analizę, JAV bronhektazės tyrimų registre, kurią atliko Eden ir kt. (125) apie netuberkuliozinių mikobakterijų (NTM) infekcijos dažnį pacientams, sergantiems bronhektaze ir AATD. Žinoma, kad NTM infekcijos yra dažnos pacientams, sergantiems bronhektaze, tačiau šis dažnis dar didesnis AATD sergančių pacientų grupėje: AATD ir bronhektaze sergančiųjų ir tų, kuriems NTM skreplių pasėlis buvo teigiamas, pacientų procentas buvo didesnis, palyginti su sergančiųjų idiopatine bronhektaze (62,8 % vs 44,9 %). Šis tyrimas papildė jau anksčiau publikuotus duomenis, kad AAT slopina greitai augančių mikobakterijų infekciją (126).

Per pastarąjį dešimtmetį AAT terapinė nauda išsiplėtė ir atrodo, kad jo savybės neapsiriboja vien plaučių audinio apsauga (127, 128). Nemažai tyrimų atliekama naudojant pakaitinę AAT terapiją gydant įvairias ne kvėpavimo takų ligas ir gaunami teigiami rezultatai. Sergant transplantato prieš šeimininką liga, pasireiškiančia žarnyno pažeidimu, AAT terapija davė fenomenalių teigiamų rezultatų tiek ikiklinikinių, tiek klinikinių tyrimų metu (129, 130). Gavus išpūdingus ikiklinikinių tyrimų duomenis (131–133), teigiama tendencija taip pat matyti pacientams, patyrusiems ūminį miokardo infarktą, kuriems buvo skirta AAT (134). Organizmo nesugebėjimas tinkamai padidinti endogeninio AAT kiekio yra susijęs su nėštumo komplikacijomis

(135, 136). Organų ir ląstelių transplantacijos tyrimai su gyvūnais taip pat rodo teigiamus rezultatus, kai jie papildomi egzogeniniu AAT (137). AAT šiuo metu yra vertinamas keliuose klinikiniuose tyrimuose. Kitos su imunitetu susijusios būklės, kurias patiriantieji ikiklinikinių tyrimų metu teigiamai reaguoja į AAT, yra reumatoidinis artritas (138), sisteminė raudonoji vilkligė (139), išsėtinė sklerozė (140), 1 tipo autoimuninis cukrinis diabetas (141) ir opinis kolitas (142), buvo įvardijamos kaip gretutinė AATD liga (143). Kalbant apie cukrinį diabetą, 3 klinikiniai tyrimai teigia, kad AAT rodo tendenciją apsaugoti kasos ląsteles nuo žūties, tačiau rezultatai vertinami kontroversiškai dėl imties dydžio ir didelės pacientų įvairovės (48, 144, 145). O atitinkamų tyrimų su gyvūnais metu, išemijos ir reperfuzijos pažeidimo atvejais, pavyzdžiui, ūminės inkstų kanalėlių nekrozės ir smegenų insulto atvejais, gauti teigiami rezultatai gydant egzogeniniu AAT (146–148).

12. Alfa-1 antitripsino deficito ryšys su LOPL ir emfizema

Alfa-1 antitripsino deficitas buvo pirmasis aprašytas genetinis lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (LOPL) rizikos veiksnys. Per daugiau nei 50 metų nuo jos aprašymo ir toliau pateikiama naujų įžvalgų apie LOPL formas (115).

Yra pastebėta, kad plaučių audinių homeostazę reguliuojantys genai dalyvauja ir sudėtinguose plaučių vystymosi procesuose. Manoma, kad AAT arba šį baltymą koduojančio geno SERPINA1 pakitimai turi įtakos plaučių audinio struktūrai, o kartu kvėpavimo funkcijai (149). Maksimali kvėpavimo funkcija suaugus pasiekama 25–30 gyvenimo metais ir yra svarbus mirštamumo ir sergamumo LOPL veiksnys. Vėliau, senstant, plaučių funkcija palengva mažėja. Sveiki asmenys senatvėje paprastai nepasiekia simptomais pasireiškiančio kvėpavimo funkcijos sumažėjimo, tačiau tam tikri žalojantys veiksniai nėštumo metu ir ankstyvuojų gyvenimo laikotarpiu gali paveikti kvėpavimo sistemos vystymąsi. Tuo atveju yra nepasiekama maksimali kvėpavimo funkcija, o dar ir dėl natūralaus mažėjimo, dažniau ir anksčiau pasiekama simptomatinė riba ir pasireiškia klinikiniai kvėpavimo sutrikimo požymiai (150).

Siekdami nustatyti FEV1 trajektorijas, Danielle C M Belgrave su bendraautoriais ištyrė tris populiacines kohortas: dvi (MAAS ir ALSPAC), kuriose nuo vaikystės iki ankstyvosios pilnametystės buvo atliekama pakartotinė spirometrija (1046 dalyviai nuo 5 iki 16 metų ir 1390 dalyvių nuo 8 iki 24 metų) ir trečia kohorta (PIAF), kurioje buvo atliekami pakartotiniai plaučių funkcijos matavimai kūdikystėje ($V_{\max FRC}$) ir vaikystėje (FEV1; 196 dalyviai nuo 1 mėnesio iki 18 metų). Šie autoriai iškėlė hipotezę, kad populiaciją sudaro kelios skirtingos grupės asmenų, kurių plaučių funkcijos

trajektorijos nuo ikimokyklinio amžiaus, t. y. jaunesnių nei penkerių metų, iki paauglystės yra panašios ir tęsiasi iki jaunų suaugusiųjų amžiaus, ir kad šios trajektorijos iš dalies susiformuoja gimimo metu. Analizė parodė, kad pagrindiniai autorių įvertinti mažesnių plaučių funkcijos rodiklių rizikos veiksniai buvo pasikartojantys švokštimo epizodai, ankstyva alerginė sensitizacija ir tabako dūmų ekspozicija.

Pi*Z ir Pi*S yra dažniausiai pasitaikantys sunkaus deficito aleliai Europos populiacijoje (107). Naujausi tyrimai rodo, kad vieno Pi*S alelio (PiMS) nešiotojai dažniausiai yra funkcionaliai normalūs. Priešingai, vieno Pi*Z alelio (PiMZ) nešiotojai turi didesnę LOPL riziką, jei jie rūko, palyginti su normaliais PiMM variantais (151). Be to, tyrimai, kuriuose vertinami su LOPL progresavimu susiję genai, parodė, kad PiMZ genotipai nepriklausomai koreliuoja su ligos progresavimu (152). Tai, kad niekada nerūkantiems PiMZ heterozigotams nepasireiškė plaučių liga, rodo genų ir rūkymo sąveikos svarbą LOPL patogenezėi (153). Reikia nepamiršti ir nagrinėti įvairius tyrimų metodologinius klausimus, įskaitant atrankos šališkumo pašalinimą neįtraukiant PiMZ probandų, objektyvių spirometrinių kriterijų taikymą LOPL diagnozei nustatyti ir kruopščią amžiaus, lyties, etninės grupės ir cigarečių rūkymo kontrolę. Tada nustatoma didesnė rizika PiMZ heterozigotams susirgti LOPL (154).

Neseniai buvo aprašyti panašūs rūkančių ir nerūkančių asmenų, kurių PiSZ genotipas heterozigotinis, rezultatai. Teigiama, kad PiSZ rūkantys heterozigotai turi didesnę emfizemos riziką (155), tačiau kitų tyrimų duomenys pateikia kontroversiškus rezultatus (151, 156).

Mažiausiai penkiuose tyrimuose aprašytas spirometrijos rodiklių mažėjimas sergant LOPL (157–161), bet nėra pastovaus veiksnio suaugusiesiems, neskaitant rūkymo, kuris nurodytų tokį pagreitėjusį rodiklių mažėjimą. Priešingai yra su vaikais. Europoje atliktame tyrime nustatyti penki veiksniai vaikystėje, kurie susiję su prastesne plaučių funkcija, spartesniu jos blogėjimu ir LOPL (162). Šie veiksniai apima motinos astmą ir rūkymą, tėvo astmą, astmą vaikystėje ir sunkias kvėpavimo takų infekcijas. Genetiniai veiksniai, ypač vystymosi genai, pavyzdžiui, ADAM33 polimorfizmai, taip pat yra svarbūs (163, 164). Taigi duomenys galbūt rodo tendenciją, kad LOPL ištakos yra antenataliniame ir ankstyvos vaikystės laikotarpyje, kai nulemiama eiga link mirtinos ligos arba link sveikų plaučių.

AATD sergantiems pacientams plaučių emfizemos klinikiniai simptomai dažniausiai pasireiškia anksčiau nei LOPL klinika, ir dažnai atrodo, kad ji yra neproporcinga pacientų rūkymo istorijai (17). Skundų turintiems pacientams plaučių funkcijos tyrimai dažnai rodo padidėjusį plaučių tūrį ir obstrukciją bei perfuzijos sutrikimą. Tačiau kartais kompiuterinės tomografijos (KT) tyrimo

metu yra stebima sunki kvėpavimo takų obstrukcija ir ryški emfizema, o dujų perfuzija gali būti normali.

Pacientams, sergantiems AATD, gali būti labai ribotas oro srauto judėjimas, kuris dažnai yra nesusijęs su jų rūkymo istorija ir jiems nėra kvėpavimo takų obstrukcijos (17). Be to, ne visada obstrukcija ir parenchimos pažeidimas yra vienu metu. Dažnai oro srauto apribojimas nėra pastovus, todėl šių pacientų atsakas į bronchus plečiančius vaistus labai skiriasi. Plaučių funkcijos sutrikimo laipsnis gali labai skirtis pacientams, turintiems tą patį AATD fenotipą / genotipą, ir gali netgi skirtis broliams ir seserims, turintiems tą patį fenotipą / genotipą. Rizikos veiksniai, galintys turėti įtakos plaučių funkcijos pokyčių greičiui sergant AATD, yra panašūs į tuos, kurie buvo nustatyti sergant LOPL (rūkymas, paūmėjimai, aplinkos poveikis, atsakas į bronchus plečiančius vaistus, amžius ir bazinė plaučių funkcija) (17).

Su AAT trūkumu susijusios LOPL plaučių pažeidimo patofiziologijos supratimas pabrėžia ankstyvos diagnostikos, tinkamų valdymo strategijų ir intervencijų, skirtų atkurti proteazės ir antiproteazės pusiausvyrą, siekiant sušvelninti ligos progresavimą ir pagerinti klinikinius rezultatus, svarbą.

13. AATD ir bronchų astma suaugusiesiems ir vaikams

AATD gali sukelti kvėpavimo sutrikimo simptomus, kurie dažnai yra panašūs sergant bronchų astma. Asmenims, sergantiems AATD, gali pasireikšti ir kosulys, ir švokštimas, ir dusulys, ir obstrukcija, kurie taip pat būdingi bronchų astmai (165). Dėl šio sutapimo kartais pateikiama klaidinga diagnozė arba pavėluotai nustatoma teisinga AATD diagnozė (166).

Ir bronchų astma, ir AATD yra susiję su kvėpavimo takų uždegimu. Tačiau AATD atveju uždegiminis procesas yra dėl nekontroliuojamo fermento neutrofilų elastazės veikimo, kas gali sukelti plaučių audinio pažeidimą ir prisidėti prie lėtinės emfizemos vystymosi (65), o bronchų astma paprastai apima eozinofilinį uždegimą ir bronchų hiperreaktyvumą (167).

Nemažai daliai vaikų, kuriems ikimokykliniame amžiuje būna dažnai besikartojantis švokštimo sindromas, vėliau paauglystėje diagnozuojama bronchų astma (168).

Yra duomenų apie didelį švokštimo sindromo ir bronchų astmos paveldimumo ryšį (169), todėl švokštimo ir su mokyklinio amžiaus bronchų astmos išsivystymo rizika susijusių genų tyrimai gali būti svarbūs.

Perspektyvusis tyrimas, į kurį buvo įtraukti ikimokyklinio amžiaus vaikai, kuriems ankstyvame amžiuje pasireiškė trumpalaikis švokštimas, ir įvertinta plaučių funkcija sulaukias šešerių metų, parodė, kad kvėpavimo takų funkcija

yra sumažėjusi (170). Kitame tyrime buvo stebimi 11 ir 16 metų švokštimo sindromu sergantys vaikai ir prieita prie tos pačios išvados (171). Be to, yra įrodymų, kad švokštimas vaikystėje gali sukelti pasikartojančius ar nuolatinis kvėpavimo takų simptomus suaugus, todėl nuolatinis švokštimas, susijęs su plaučių funkcijos sutrikimais, dažniausiai atsiranda pirmaisiais gyvenimo metais (23, 172). Be to, žinoma, kad rūkymas yra labai svarbus veiksnys, bloginantis suaugusiųjų plaučių funkciją ir lemiantis lėtinę obstrukcinę plaučių ligą (LOPL), tačiau suaugusiųjų plaučių funkcijos pablogėjimą taip pat gali lemti veiksniai, su kuriais susiduriama ankstyvuojų gyvenimo laikotarpiu (162, 173). Ankstesnė apžvalga taip pat parodė, kad vystymosi veiksniai, susiję su įvairiais biologiniais mechanizmais, blogina kvėpavimo takų funkciją augimo metais, todėl didina LOPL riziką (174). Velingtone atlikto tyrimo tikslas buvo ištirti įvairių žinomų LOPL rizikos veiksnių ryšį, kuris parodė stipriausią ryšį tarp bronchų astmos vaikystės ir LOPL (175).

Vaikai, kuriems pasireiškia švokštimas, gali turėti esminių genetinių veiksnių, galinčių sukelti jų ankstyvojo gyvenimo kvėpavimo takų sutrikimus ir LOPL išsivystymą vėliau. Tam tikri genetiniai variantai, tokie kaip SERPINA1 geno polimorfizmai, gali prisidėti prie švokštimo vaikystėje ir suaugusiųjų kvėpavimo takų sutrikimų.

Remiantis Švedijos naujagimių patikros duomenimis, 16 ir 22 metų pacientams ikimokyklinio amžiaus pasikartojantis švokštimas ir gydytojo diagnozuota bronchų astma vėlesniame amžiuje buvo dažnesnė tarp PiZZ genotipą turinčių asmenų, nei tarp tokio paties amžiaus neturinčių AAT sutrikimų asmenų (176). Priešingai, kituose tyrimuose nepavyko rasti ryšio tarp SERPINA1 polimorfizmų ir pasikartojančio švokštimo ar bronchų astmos (177), todėl vis dar diskutuojama apie AATD ir vaikystės bronchų astmos ryšį (178, 179).

Virusinės infekcijos ir aplinkos teršalai (pvz., rūkymas) yra pagrindiniai švokštimo ligų priežastiniai veiksniai ankstyvoje vaikystėje. Daugeliui vaikų, kuriems pasireiškia ikimokyklinis švokštimo sindromas, mokykliniame amžiuje išsivysto atopinė alerginė bronchų astma (180). Tiksliau, nuolatiniai švokštimo fenotipai (mokykliniame amžiuje prasidėjęs ir išliekantis, vėlyvoje vaikystėje prasidėjęs ir išliekantis bei nuolatinis švokštimo fenotipai) yra susiję su bronchų astmos diagnoze. Nepaisant to, virusinės infekcijos ar aplinkos poveikis ne visiems vaikams sukelia švokštimo sindromą arba visais atvejais dėl švokštimo išsivysto bronchų astma (181, 182), o tai rodo, kad genotipas vaidina svarbų vaidmenį. Be to, dėl AAT trūkumo plaučių nesugebėjimas tinkamai apsisaugoti gali sustiprinti bronchų astmos

simptomus ir sukelti dažnesnius bei sunkesnius priepuolius, dėl to kyla sunkesnių kvėpavimo takų komplikacijų rizika (183).

Homozigotiniams AATD asmenims dėl Pi*Z alelio (PiZZ) vaikystėje paprastai nediagnozuojama emfizema, nors jiems gali padidėti astmos išsivystymo tikimybė (41). Tačiau emfizema ir bronchų astma gali pasireikšti suaugusiųjų gyvenime.

Yra suaugusiųjų tyrimų, kurie parodė ryšį tarp AATD ir bronchinės astmos, ypač jos sunkumo ir paūmėjimų (165, 184, 185), tačiau daugiau tyrimų, kurių rezultatai kontroversiški (186–188).

Kaip minėta anksčiau, aplinkos teršalų poveikis plaučiams, profesinė aplinka ir rūkymas gali prisidėti prie negrįžtamos ir progresuojančios plaučių ligos (189). Buvo pranešta, kad pasyvaus rūkymo ir aplinkos oro teršalų poveikis vaikystėje yra reikšmingas suaugusiųjų su AATD susijusios emfizemos išsivystymo rizikos veiksnys (190, 191).

14. AATD ir kepenų ligos suaugusiesiems ir vaikams

Su AAT susijęs kepenų pažeidimas pasireiškia dėl nenormalių AAT baltymo sankaupų hepatocituose (192). Šia liga susergama tik dėl genotipų, susijusių su patologine AAT polimerizacija hepatocitų endoplazminiame tinkle. Dauguma pacientų, sergančių su AAT susijusia kepenų liga, yra homozigotiniai Pi*Z aleliui (PiZZ genotipas). Kepenų liga nenustatoma nulinėms homozigotoms, turinčioms didelį AAT trūkumą, nes joms nenustatomas polimerų kaupimasis hepatocituose (77).

Mutavęs Pi*Z AAT baltymas yra tinkamai transkribuojamas ir transliuojamas, tačiau ši mutacija paveikia baltymo konformaciją reaktyviosios vietos srityje ir trukdo tinkamai susilankstyti (193). Sėkmingai išsiskiria tik 15 % tokio baltymo. Likę 85 % molekulių niekada nepasiekia sekrecijai tinkamos konformacijos ir lieka hepatocyte. Tokiu atveju kepenų pažeidimą sukelia Pi*Z baltymo polimerų kaupimasis, kuris inicijuoja kepenų ląstelių žūtį, apoptozę, kompensacinę proliferaciją ir fibrozės kaskadą, lemiančią vėžinius pokyčius (194). Tačiau ne visiems PiZZ fenotipą turintiems pacientams išsivysto kepenų cirozė ir kepenų ligos. Ligos progresavimui didelę įtaką turi genetinių ir aplinkos veiksnių visuma.

Nors PiZZ genotipą lemia vieno geno defektas, kepenų liga, kaip ir kvėpavimo takų pažeidimas, pasireiškia labai įvairiai. Ši liga gali pasireikšti bet kokiame amžiuje ir gali būti pastebima jau praėjus 1–2 mėnesiams po gimimo. 4–10 % alfa-1-antitripsino trūkumą turinčių vaikų per pirmuosius dvidešimt gyvenimo metų išsivysto kliniškai reikšminga kepenų liga, todėl

alfa-1-antitripsino trūkumas yra dažniausia genetinė vaikų kepenų ligų priežastis ir dažniausia paveldima kepenų transplantacijos indikacija vaikų populiacijoje (195–197). Kasmet dėl alfa-1 antitripsino trūkumo Jungtinėse Amerikos Valstijose atliekama apie 50 kepenų transplantacijų vaikams (198).

Kūdikiams per pirmuosius du gyvenimo mėnesius dažnai pasireiškia užsitęsusi cholestazinė gelta. Dėl sutrikusios tulžies tėkmės gali sutrikti maisto įsisavinimas ir prastai augti svoris, atsirasti pilvo pūtimas, niežulys, hepatosplenomegalija, ascitas, hipercholesterolemija arba lengvai atsirasti kraujavimas ir mėlynės (195). Atlikus laboratorinius tyrimus gali būti nustatytas padidėjęs alaniminotransferazės (ALT), aspartataminotransferazės (AST), bendrojo ir tiesioginio bilirubino, šarminės fosfatazės ir gama glutamiltranspeptidazės (GGT) kiekis. Be to, gali pasireikšti riebaluose tirpių vitaminų trūkumas (mažas vitamino D, vitamino A, vitamino K ir vitamino E kiekis), hipoalbuminemija ir koagulopatija. Nors nedidelei daliai sergančių kūdikių kūdikystėje išsivysto kepenų cirozė, portinė hipertenzija ir kepenų nepakankamumas (197), 80 % alfa-1 antitripsinu sergančių kūdikių, kuriems nustatyta cholestazė, ji išnyksta savaime ir iki 18 metų jie atrodo sveiki, neturintys klinikinių lėtinės kepenų ligos požymių (199, 200).

J.Teckeman ir kt. (201) nustatė, kad AATD naujagimių cholestazės atveju dominuoja vyriškoji lytis (65 % vyrų, $p = 0,04$), naujagimių gama-glutamiltanspeptidazės padidėjimas siejamas su sunkesne ligos pradžia, o naujagimių cholestazės progresavimas į portinę hipertenziją yra dažnesnis nei anksčiau (41 %) ir pasireiškia 5 mėnesių amžiaus. Pacientams, kuriems buvo naujagimių cholestazė ir kuriems vėliau buvo atlikta kepenų transplantacija, jos metu buvo gerokai jaunesni nei tie, kuriems naujagimių cholestazė nebuvo nustatyta (4,1 ir 7,8 metų, $p = 0,04$, bendras intervalas 0,3–17 metų). Prieš transplantaciją buvo dažna koagulopatija ir venų varikozė, tačiau kraujavimas iš virškinimo trakto – ne. Naujagimių cholestazė taip pat turėjo neigiamą įtaką augimo parametrams.

AAT trūkumas dažniausiai pasitaiko europietiško gymio asmenims. XX a. septintojo dešimtmečio pradžioje Švedijoje atliktas svarbiausias naujagimių patikros tyrimas suteikė svarbios informacijos apie šią ligą. Atlikus daugiau nei 200 000 Švedijos naujagimių atrankinę patikrą, tyrimo metu buvo nustatyti 127 kūdikiai, turintys PiZZ variantą (110). Juos ištyrus nustatyta, kad daugiau kaip 80 % sirgo naujagimių cholestaze, kuri spontaniškai išnyko ir tie vaikai buvo sveiki sulaukę 18 metų amžiaus. Tik apie 3 % pacientų kepenų liga progresavo iki sunkios, gyvybei pavojingos kepenų ligos (199). Daugumos šių kūdikių fizinio ištyrimo duomenys buvo normalūs, kai kurių kepenų funkcijos fermentų koncentracijos padidėjimas buvo nedidelis, o tai rodo, kad, neatlikus

nešališkos naujagimių patikros, šiems kūdikiams liga greičiausiai nebūtų diagnozuota. Panašūs, bet ne tokie išsamūs tyrimai JAV patvirtino šias išvadas. Tačiau neaišku, ar tie patys rezultatai būtų gauti heterogeniškesnėje populiacijoje, susijusioje su kitokiu modifikuojančių genų rinkiniu, pavyzdžiui, tyrimai Jungtinėje Karalystėje ar Pietų Amerikoje (202). Taip yra todėl, kad daugelyje retrospektyviųjų PiZZ genotipą turinčių vaikų tyrimų aprašyta nedaug atvejų, kai vaikams vėliau vaikystėje, įskaitant paauglystę, išsivystė sunki kepenų liga, o tarp jų yra tik keletas vaikų, nesirgusių naujagimių cholestaze, bet kuriems išsivystė sunki liga (203). Gali būti, kad šiose populiacijose yra genetinių skirtumų ir kad sunki kepenų liga vėlesnėje vaikystėje pasitaiko rečiau nei 1 iš 127 (204). Kiti reti simptomai kūdikiams, išskyrus naujagimių cholestazę, yra koagulopatija dėl vitamino K trūkumo, prastas apetitas, kraujavimas iš virškinimo trakto ir ūminis kepenų nepakankamumas. Šie retai pasitaikantys simptomai taip pat nebuvo pastebėti Švedijos tiriamųjų grupėje.

Vyresnių vaikų, sergančių AAT trūkumu, būklė taip pat yra labai įvairi ir gali būti atsitiktinai nustatyta atliekant kraujo tyrimą arba esant kepenų ligos požymių ar simptomų, įskaitant maitinimosi sunkumus dėl prasto apetito, sulėtėjusį vystymąsi, augimą ar besimptomę hepatosplenomegaliją, nustatytą įprastinių tyrimų metu. Retais atvejais kai kuriems vaikams gali net ūmiai pasireikšti portinės hipertenzijos simptomai ar požymiai, pasireiškiantys kraujavimu iš virškinimo trakto, trombocitopenija ar kitais ūminio kepenų nepakankamumo požymiais. Dažnai gerai atrodantiems homozigotinį PiZZ variantą turintiems vaikams būna epizodinis, bet daugelį metų besitęsiantis nežymus ALT padidėjimas, nesant jokių kitų kepenų pažeidimo požymių. Nors dažniausiai biopsijos nereikia, bet jei ji atliekama, vyresniems vaikams kepenyse paprastai aptinkama didelių globulių periportaliniuose hepatocituose, lengva mikrovezikulinė steatozė ir lengvas lobulinis uždegimas (200).

Vaikams, anksčiau sirgusiems naujagimių hepatitu ir spontaniškai pasveikusiems, vėliau, pirmajame ar antrajame gyvenimo dešimtmetyje, kartais išsivysto sunki kepenų liga, kai yra kompensuota, bet stabili kepenų cirozė ir portinė hipertenzija (205–207).

Jauniems ir vidutinio amžiaus suaugusiems žmonėms, kuriems yra PiZZ mutacija, retai pasitaiko naujų sunkių kepenų ligų (66). Tačiau sunkios kepenų ligos ir cirozės rizika didėja su amžiumi. Visą gyvenimą rizika susirgti kepenų ciroze gali siekti net 40 % (208).

Suaugusiems kepenų liga dažnai nepastebima, kol neišryškėja kepenų cirozė arba hepatocelulinė karcinoma. Amerikos krūtinės ląstos draugija ir Europos respiratologų draugija rekomenduoja reguliariai vertinti PiZZ

sergančių asmenų kepenų funkcijos tyrimų rezultatus (66). Tačiau neaišku, ar šie kepenų funkcijos tyrimai gali būti naudojami kepenų ligos prognozei nustatyti (209).

Suaugusiesiems, sergantiems AAT trūkumu, gali išsivystyti progresuojanti kepenų liga, kurios vystymąsi skatina rizikos veiksniai (210). Šie rizikos veiksniai yra infekcijos (CMV ir virusiniai hepatitai B ir C) (211), genetinės ligos (cistinė fibrozė), amžius >50 metų ir kitos gretutinės ligos, tokios kaip cukrinis diabetas, metabolinis sindromas ir nutukimas (209, 212). Alkoholio vartojimas ir hepatotoksinių medikamentų, ypač nesteroidinių vaistų nuo uždegimo, vartojimas gali sustiprinti šių asmenų kepenų fibrozę, nors tiksli jų įtaka ligos progresavimui lieka neaiški (213), kaip ir dėl virusinio hepatito yra kontroversiškų nuomonių bei publikacijų, kurios nerodo, kad virusinis hepatitas didintų AAT trūkumu sergantiems asmenims kepenų nepakankamumo riziką (210).

Įdomu, kad daugiau nei du trečdaliai visų pacientų, kuriems reikia kepenų transplantacijos dėl AATD, yra vyrai, o tai rodo, jog vyriškoji lytis galimai yra vienas iš rizikos faktorių (214). Lyties įtaka taip pat buvo įrodyta transgeniniuose AATD pelių modeliuose, kur pelių patelių alfa-1 antitripsino Pi*Z mutacijos sąlygotų ir endoplazminiame tinkle besikaupiančių polimerų buvo daug mažiau, palyginti su patiniais, bet joms pradėjus papildomai skirti testosterono, išsivystė klasikinė su AATD susijusi kepenų liga (215).

Taigi yra aišku, kad esant nežinomos etiologijos kepenų ligai, reikėtų ieškoti AATD.

Nors AATD paprastai diagnozuojamas pacientams, kuriems mutacija yra homozigotinė, Perlmutteris ir kolegos nustatė, kad nemaža dalis suaugusių pacientų, kuriems buvo atlikta kepenų transplantacija dėl AATD, iš tikrųjų buvo heterozigotiniai (dažniausiai PiMZ), taip pat PiSZ (216–218). Be to, pastebėtas ryšys su retu MMaltono variantu, kuris taip pat sukelia AAT baltymo polimerizaciją (219). Taip pat yra nustatyta ir SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų (SNP) bei endoplazminio tinklo baltymų (kalneksinas, ERmanI) įtaka kepenų ligos vystymuisi (220–222).

Taigi galima teigti, kad nustatymas, ar pacientai turi vieno ar abiejų alelių mutacijų, gali duoti teigiamų atokiųjų rezultatų.

Buvo bandoma patikslinti pacientų, sergančių kepenų ir plaučių ligomis, identifikavimą atliekant savanorišką patikrinimą-atranką. Vienas didžiausių tokių patikrinimų buvo atliktas Švedijoje 1976 metais – naujagimių, kiti panašūs atrankos tyrimai atlikti Oregono valstijoje Jungtinėse Amerikos Valstijose 1978 m., Olandijoje – 1980 m., Belgijoje – 1988 m., Niujorko valstijoje – 1993 m., o šiuo metu atliekama naujagimių atrankinė patikra Centrinėje Lenkijoje. Didžiausios atrankinės patikros metu Švedijoje surinkti

duomenys buvo palyginti su kontrolinės tiriamųjų grupės ir pastebėta, kad pagrindinės grupės tiriamiesiems pasireiškė ne tik su kepenų ligomis susiję klinikiniai simptomai, bet ir buvo aptikta kitų laboratorinių pakitimų, kurie kitu atveju būtų likę nepastebėti. Vis dėlto tik 8–10 % šių PiZZ homozigotų per pirmuosius keturis gyvenimo dešimtmečius išsivystė sunki kepenų liga. Tai rodo, jog yra kitų, dar nežinomų ligai turinčių įtakos modifikatorių / faktorių (223).

Taigi tobulėjant tyrimų metodikai ir atsirandant daugiau įrodymų, patvirtinančių atrankinės patikros pranašumus, galima apsvarstyti galimybę įtraukti AATD nustatymą į visuotinę naujagimių patikrą (224, 225). Be to, visuotinės patikros metodu gaunami tiesioginiai duomenys apie AAT alelių dažnį tiriamoje populiacijoje.

Panašu, kad dėl šių priežasčių AAT paplitimas daugiausia tiriamas tikslinėse grupėse, pavyzdžiui, sergančiųjų LOPL. Tokių tyrimų tikslas yra nustatyti didesnės rizikos atvejus ir anksti pradėti taikyti prevencines priemones.

Šiuo metu vienintelis patvirtintas su AATD susijusios sunkios kepenų ligos gydymo būdas yra ortotopinė kepenų transplantacija. Tačiau pastaruoju metu padaryta didelė pažanga kuriant naujus gydymo metodus, galinčius išsaugoti kepenis ir užkirsti kelią hepatotoksiškumui. Buvo pasirinktos kelios kryptys. Viena jų – skatinti AAT pernešimą iš endoplazminio tinklo, kita – skatinti AAT degradaciją ir slopinti polimerų susidarymą (120).

Autofagija buvo pagrindinis taikiny, nes šiuo būdu vyksta intraląstelinė AAT degradacija. Autofagijai skatinti buvo naudojamos tiek fizinės modifikacijos, tiek vaistai. Taip pat kuriamos genetinės terapijos, siekiant sustiprinti autofagiją arba tiesiogiai modifikuoti mutavusį geną (226).

TYRIMO METODAI

Medžiaga ir duomenys biomedicininiam tyrimui buvo renkami keliais etapais: pirma – duomenys rinkti iš populiacinės ALSPAC (*The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*) kohortos. Kitas etapas – duomenys rinkti 2019–2023 m. perspektyviojo atvejo-kontrolės tyrimo, kuris vykdytas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Vaikų ligų klinikoje, metu. Vaikai, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, į tyrimą taip pat įtraukti Kaune, Telšiuose, Kelmėje, Kėdainiuose, Utenoje.

15. ALSPAC kohortos tiriamoji grupė

15.1. Tyrimo imtis ir tiriamųjų atranka

Eivono išilginis vaikų ir tėvų tyrimas (*Avon Longitudinal Study of Children and Parents* (ALSPAC)) buvo sukurtas siekiant suprasti, kaip genetinės ir aplinkos savybės daro įtaką tėvų ir vaikų sveikatai bei vystymuisi. Tai yra išilginis, populiacinis gimimo kohortos tyrimas, į kurį buvo įtrauktos kūdikių besilaukiančios moterys, gyvenančios Eivono apylinkėse, Jungtinėje Karalystėje. Į tyrimą buvo įtraukta 14 541 nėščioji, kurių numatoma gimdymo data buvo nuo 1991 m. balandžio mėn. iki 1992 m. gruodžio mėn. 13 988 gyvi gimę kūdikiai išgyveno iki vienerių metų amžiaus. Papildomi dalyviai (N = 713) buvo įtraukti vėlesniuose etapuose, todėl bendras tiriamųjų skaičius buvo 14 701, iš jų 7964 turėjo visus reikiamus duomenis tyrimui.

15.2. Bioetikos reikalavimai

Buvo gautas ALSPAC etikos ir teisės komiteto ir vietos mokslinių tyrimų etikos komitetų leidimas atsirinkti reikiamus duomenis ir jais naudotis. Išsami informacija apie ALSPAC metodiką buvo paskelbta atskirai ir ją galima rasti adresu: <http://www.bristol.ac.uk/alspac>.

Tyrimo interneto svetainėje pateikiama išsami informacija apie visus turimus duomenis, kuriuos galima rasti išsamioje duomenų bazėje (<http://www.bris.ac.uk/alspac/researchers/data-access/data-dictionary/>).

15.3. Duomenų rinkimas

Pagal išsikeltą tikslą iš duomenų bazės buvo atrenkami tie tyrimo dalyviai, kurie turėjo duomenis apie švokštimo sindromą, duomenis apie gydytojo

diagnozuotą bronchų astmą ir kuriems buvo nustatyti AAT genotipai bei SERPINA1 geno polimorfizmai.

Duomenys apie vaikų švokštimą buvo renkami naudojant klausimynus, kuriuos tėvai pildė maždaug kartą per metus, keliais laiko intervalais, kai vaikui sueidavo numatytas amžius (6/18/42/54/57/65/81 ir 103 mėnesiai) – pradedant nuo 6 mėnesių amžiaus. Plaučių funkcija ir informacija apie bronchų astmos diagnozę buvo matuojama dviem atskirais laiko momentais, maždaug kai vaikai buvo 8 ir 15 metų.

Remiantis švokštimo sindromo fenotipo klasifikacija, tiriamieji buvo suskirstyti į tokius švokštimo fenotipus: a) niekada / vienkartinis švokštimas (66,6 %), maždaug 10 % švokštimo sindromo epizodų pasireiškia po 6 mėnesių amžiaus, o vėliau sporadinio švokštimo epizodų mažėja, įskaitant dalyvius, kurie niekada nešvokštė; b) ikimokyklinio amžiaus protarpinis (pasikartojantis) švokštimas (16,6 %), vidutinis švokštimo sindromo pasireiškimo amžius 18 mėnesių (1,5 metų) ir nuo 69 mėnesių (5–6 metų) mažėjantis; c) vidurio vaikystės protarpinis (pasikartojantis) švokštimas (5,1 %), didžiausias švokštimo pasireiškimas apie 54 mėnesių (4,5 metų) amžių, palaipsniui mažėjantis ir iki 128 mėnesių (10–11 metų) lieka protarpiniai epizodai; d) mokyklinio amžiaus išliekantis švokštimas (2,8 %) iki 42 mėnesių (3,5 metų) buvo retai pasitaikantis švokštimo epizodas, tada sparčiai didėjo ir pikas pasiekiamas maždaug 103 mėn. (8,5 metų) amžiuje, o paskui iki 198 mėnesių amžiaus (16,5 metų) mažėjo ir išliko iki vidutinio pasireiškimo; e) vėlyvos vaikystės išliekantis švokštimas (3,6 %), kurio pasireiškimas pirmaisiais gyvenimo metais buvo retas ir sparčiai didėjo, o piką pasiekė po 166 mėnesių amžiaus (13–14 metų); f) nuolatinis švokštimas (5,2 %), vidutinis švokštimo pasireiškimas po 6 mėnesių ir vidutinis ar didelis paplitimas po to.

SERPINA1 geno polimorfizmai (rs6647, rs11832, rs17580, rs709932, rs1243160, rs2854254, rs8004738, rs17751769, rs28929470, rs28929474) buvo atrinkti remiantis ankstesniais suaugusiųjų tyrimais, kuriais nustatyta, kad šie VNP yra susiję su didesne LOPL rizika arba poveikiu plaučių funkcijai (227).

15.4. Tyrimo metodai

Genotipų nustatymas atliktas *Wellcome Trust Sanger Centre*, Kembridže, Jungtinėje Karalystėje, ir *Laboratory Corporation of America*, Burlingtone, NC. Buvo naudojama „Illumina HumanHap 550“ matrica („Illumina“, San Diegas, Kalifornija).

Tiriamųjų atmetimo kriterijai buvo šie: lyties nesutapimai, minimalus arba per didelis heterozigotiškumas (superdominavimas), neproporcingai didelis atskirų delecijų kiekis ($> 3\%$), kriptinis giminingumas, matuojamas kaip tapatumo pagal kilmę dalis ($IBD > 0,1$), ir nepakankamas mėginio atsikartojimas ($IBD < 0,8$).

Populiacijos stratifikacijos įrodymai buvo įvertinti naudojant daugiamatę skalės analizę ir palyginti su „HapMap II“ (22 versija); neeuropietiškos kilmės asmenys buvo pašalinti.

Buvo atrinkti tik tie VNP, kurių alelių dažnis buvo ne mažesnis kaip 1% , signalų dažnis ne mažesnis kaip 95% ir kurie nepažeidė Hardy ir Weinbergo pusiausvyros dėsių ($P < 5 \times 10^{-7}$).

Genotipo priskyrimas buvo atliktas naudojant Markov Chain Haplotyping programinę įrangą (MACH v.1.0.1617) ir fazinius CEU tiriamųjų haplotipų duomenis (HapMap release 22, phase II NCBI B36, dbSNP 126).

Išsamią informaciją apie duomenų generavimo procesą galima rasti internete: <http://www.bristol.ac.uk/media-library/sites/alspac/migrated/documents/gwas-data-generation.pdf>

15.5. Statistinės analizės metodai ALSPAC kohortai

ALSPAC tyrimo centro biostatistikos specialistams buvo suformuotos užduotys ir atliktas statistinis duomenų apdorojimas. Duomenys apdoroti naudojant statistinės programinės įrangos paketą R (versija 3.4.2, 2017-09-28) („The R Foundation for Statistical Computing“, Viena, Austrija). Naudojome poLCA for R (Linzer, Drew A. ir Jeffrey Lewis. 2013. „poLCA: Polytomous Variable Latent Class Analysis“. R paketo 1.4. versija (<http://dlinzer.github.com/poLCA>), kad būtų nustatyti skirtingi švokštimo fenotipai pagal klausimyno atsakymus. Buvo pasirinktas šešių klasių modelis, nes anksčiau jis buvo tinkamiausias ir analizės metu buvo gautos mažiausios AIC vertės. Įvairių SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų sąsajoms su švokštimo fenotipais ir gydytojo diagnozuota bronchų astma 15 metų amžiuje analizuoti naudotos logistinės regresijos (*Multivariate logistic regression, Wald statistic*).

Dvipusė p reikšmė $< 0,05$ buvo laikoma reikšminga.

16. *PresWeezAging* LT kohorta

16.1. Tyrimo imtis ir tiriamųjų atranka

Leidimas biomedicininiam tyrimui gautas septyneriems metams (nuo 2016 m. rugsėjo 28 d. iki 2023 m. balandžio 1 d). Per visą tyrimo laikotarpį į tyrimą planuota įtraukti 150 pagrindinės grupės (PG) tiriamųjų ir iki 60 kontrolinės grupės (KG) tiriamųjų. Per šešerius metus į biomedicininį tyrimą iš viso įtraukti 150 iki 72 mėnesių vaikų, kuriems nustatytas bronchų obstrukcijos sindromas. 5 tiriamuosius reikėjo ekskliuduoti: 3 dėl mėginyje įvykusios hemolizės ir 2 dėl neteisingai paimto mėginio. Taigi 145 vaikai, kuriems diagnozuotas bronchų obstrukcijos sindromas, buvo kaip pagrindinė tiriamųjų grupė ir 74, taip pat iki 72 mėnesių amžiaus, kontrolinės grupės vaikai. Kontrolinės grupės rinkimas buvo sklandus ir visi mėginiai tinkami. Į tyrimą įtrauktų vaikų skaičiui turėjo reikšmės ir dėl COVID-19 pandemijos paskelbtas karantinas, kurio metu tiek gerokai sumažėjo ambulatorinių konsultacijų, tiek hospitalizacijų skaičius. Laikant, kad disertacijos metu faktiškai pavyko surinkti planuotą tiriamųjų kohortą, planas įvykdytas 100 % pagal planuotą ištirti vaikų skaičių.

Dalyvauti buvo siūloma visiems iki 72 mėnesių vaikams, kurie atvyko konsultuotis arba gydytis pas vaikų pulmonologą arba vaikų ligų gydytoją dėl švokštimo sindromo tiek ambulatoriškai, tiek į stacionarą. Švokštimo epizodas galėjo būti ūminis, pirmą kartą gyvenime įvykęs, arba vaikas jau buvo gyvenime turėjęs švokštimo epizodą (-ų) ir tuo metu kreipėsi dėl pakartotinai atsiradusio švokštimo sindromo. Jiems dėl su biomedicininio tyrimu nesusijusių priežasčių, o tik pagal medicininės indikacijas reikėjo atlikti kraujo tyrimus. Kraujas galėjo būti tiek kapiliarinis, tiek veninis, paimtas į mėgintuvėlį su EDTA.

Kontrolinė grupė – 74 ikimokyklinio amžiaus (72 mėnesių) gretutinių kvėpavimo takų ligų neturintys vaikai, kurie dėl įvairios chirurginės patologijos (pilvo sienos ir kirkšnies išvaržos (52,7 %), portveino dėmės (14,9 %), gerybiniai navikai (8,1 %), kraujagyslių malformacijos (8,1 %), cistiniai dariniai (6,8 %), hemorojiniai mazgai (2,7 %) ir kiti pavieniai atvejai (6,8 %)) buvo hospitalizuoti ir kuriems kraujo ėminys būtinas dėl bendrų klinikinių indikacijų ruošiantis operacijai.

Iš viso tyrime dalyvavo 145 pagrindinės grupės vaikai, kuriems pasireiškė ūminis švokštimo sindromas ir papildomai, kaip kontrolinė grupė, buvo atrinkti 74 kvėpavimo sutrikimų neturintys vaikai, kurie buvo hospitalizuoti dėl įvairios chirurginės patologijos ir kuriems reikėjo paimti kraujo mėginį ruošiantis operacijai.

Tyrimas buvo nekomercinis, tiriamieji ir tyrėjai, dalyvaujantys tyrime, neturėjo finansinės naudos.

Vilniuje apie hospitalizuotus vaikus, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, mane informuodavo skyriuje dirbantis atsakingas gydytojas. Tada tiriamųjų apžiūrą, apklausą ir atranką bei informacijos teikimą tėvams, taip pat sauso kraujo lašo mėginius iš liekamojo kraujo atlikau aš pati. Kituose miestuose buvo priskirti kiti atsakingi ir apmokyti gydytojai.

Šis tyrimas neatspindi bendros populiacijos, nes buvo atrinkta tikslinė tiriamųjų, kurie skundėsi bronchų obstrukcijos sindromu – švokštimu, grupė, tačiau neabejotinai galima daryti tam tikras bendrai populiacijai būdingas išvadas ir atlikti epidemiologinius skaičiavimus, ypač kalbant apie genotipus, nes faktorių reikšmė atsiranda jau begyvenant, gimus asmeniui, turinčiam šį sutrikimą, kuris jau turi įtakos ligos eigai bei sunkumui. Dalis tiriamųjų buvo iš kitų Lietuvos miestų, kurie yra skirtinguose regionuose (Klaipėda, Telšiai, Kėdainiai, Utena, Kaunas), tad tyrimas multicentrinis, apsaugo nuo klaidingų interpretacijų ir leidžia išryškinti svarbiausius dėsningumus ir tendencijas, apima platesnį Lietuvos švokščiančių vaikų klinikinį vaizdą, neapsiribodamas vien sostinės gyventojais.

16.2. Bioetikos reikalavimai

Biomedicininis tyrimas „Alfa-1 antitripsino variantų ir koncentracijos ryšys su ūminiu ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu“ atliktas gavus Lietuvos bioetikos komiteto 2016 m. rugsėjo 28 d. leidimus: Nr. L-16-07/1, Nr. L-16-07/2, Nr. L-16-07/3 (1–3 priedai).

Prieš vaikus įtraukiant į tyrimą, tėvams / globėjams buvo išsamiai paaiškintas tyrimo tikslas ir eiga. Sutikusių dalyvauti tėvų / globėjų buvo prašoma pasirašyti paruoštą informuoto asmens sutikimo formą.

16.3. Duomenų rinkimas

Pirminio vizito metu tėvams / globėjams sutikus ir pasirašius sutikimo dalyvauti tyrime formą (dviem egzemplioriais), vienas egzempliorius buvo paliekamas tėvams / globėjams, kitas – saugomas biomedicininio tyrimo tyrėjų. Tėvams / globėjams pasirašius asmens informavimo ir sutikimo dalyvauti tyrime formą, buvo surenkama demografinė (gimimo data, lytis, įtraukimo į tyrimą data), antropometrinė (ūgis, svoris) informacija apie tyrimo dalyvį, dalyvis buvo apžiūrimas ir įvertinamas kliniškai netaikant invazinių tyrimo metodų (klinikinis kvėpavimo įvertinimas balais, naudojant *Pediatric*

Respiratory Assessment Measure (PRAM) (4 priedas) vertinimo skalę, kūno temperatūrą). Jei atitiko įtraukimo kriterijus, dalyvis buvo įtraukiamas į tyrimą.

Pirminio vizito metu buvo surenkama ir specialioje anketoje (5 priedas) pažymima informacija apie dalyvio pastarojo švokštimo epizodo eigą (švokštimo pradžios data, hospitalizacija, hospitalizacijos trukmė, klinikinė diagnozė, ar tai pirmą kartą gyvenime įvykęs švokštimo epizodas). Renkami tiriamojo ligos anamnezės, gyvenimo anamnezės (kliniškai išreikštas alerginis rinitas, atopinis dermatitas, alergija maistui), vakcinavimo, šeimos anamnezės duomenys. Renkami ankstesnių alergologinių tyrimų (odos dūrio mėginių ir specifinių imunoglobulinų E įkvėpiamiesiems alergenams) duomenys (jei atlikti). Buvo įtraukiami tik tie pacientai, kuriems pagal medicininės indikacijas, nesusijusias su biomedicininio tyrimu, reikėjo atlikti kraujo mėginius. Jeigu kraujo tyrimas nebuvo atliekamas, tai buvo kaip atmetimo kriterijus ir tiriamasis į tyrimą neįtrauktas. Iš liekamojo kraujo buvo imami sauso kraujo lašo mėginiai specialioje sugeriamojo popieriaus kortelėje (*Alpha-kit*) (6 priedas). Tinkamai paruoštos kraujo mėginių kortelės per dvi savaites nuo mėginio paėmimo buvo siunčiamos į Valstybinio tuberkuliozės ir plaučių ligų instituto Genetikos ir klinikinės imunologijos departamento laboratoriją Varšuvoje, Lenkijoje (Department of Genetics and Clinical Immunology, National Institute of Tuberculosis and Lung Diseases, 26 Plocka str, 01-138 Warsaw, Poland, tel. +48 22 43 12 158). Ten buvo atliekamas alfa-1 antitripsino koncentracijos nustatymas, fenotipo nustatymas, genotipo nustatymas ir prirėkus DNR sekos nustatymas. Gavus tyrimų rezultatus buvo informuojami dalyvio tėvai / globėjai.

16.4. Tyrimo metodai

AAT koncentracijai iš sauso kraujo lašo nustatyti buvo naudojamas nefelometrinis metodas (*Immagine 800 Immunochemistry System, Beckman Coulter*).

AAT fenotipo analizė sauso kraujo lašo medžiagoje atlikta izoelektrofokusavimo (IEF) metodu, naudojant „Hydragel 18A1AT Isofocusing“ rinkinį („Hydrasys Focusing“, „Sebia“) ir „Sebia HydraSys“ elektroforezės platformą (228).

Du dažniausiai pasitaikantys SERPINA1 geno variantai – PI*Z ir PI*S – buvo nustatyti naudojant sauso kraujo lašo medžiagą ir realaus laiko PGR metodą. Genominė DNR buvo išskirta iš sauso kraujo lašo naudojant

komercinį rinkinį „Extract-N-Amp Blood PCR Kits“ („Sigma-Aldrich“) arba „Bio-Trace DNA Purification Kit“ („EURx Ltd.“).

Eliuate esanti genetinė medžiaga buvo tiesiogiai naudojama AAT genotipavimui ir sekos nustatymui neišgryninus DNR. Pi^*Z ir Pi^*S alelių identifikavimas buvo atliktas per vieną reakciją taikant realaus laiko PGR („LightCycler 480 II“ prietaisas, „Roche Diagnostics Ltd.“) metodą, naudojant 3'- mažojo griovelio (MGB) hidrolizuojančius zondus, komplementarius laukiniam tipui ir mutantiniams variantams, sujungtus su dviem skirtingais fluorescenciniais dažais – FAM ir VIC.

Reti AAT variantai buvo nustatyti tiesioginiu Sangerio sekoskaitos metodu. SERPINA1 II–V egzonų sekos analizė buvo atlikta 16- kapiliariniu 3130xl genetiniu analizatoriumi („Genomed“, Lenkija) (229).

Švokštimo sunkumas, kuris buvo skirstomas į lengvą, vidutinį ir sunkų, buvo apskaičiuotas naudojant Vaikų kvėpavimo vertinimo skalę (PRAM). Ieškojome ryšio tarp AAT koncentracijos ir švokštimo sunkumo ir tarp AAT genotipų ir švokštimo sunkumo.

Remiantis anamnezės ir objektyvaus tyrimo duomenimis, buvo diagnozuotas peršalimas. Tėvų nusiskundimai (karščiavimas, sloga, kosulys) ir objektyvūs tyrimo duomenys buvo vertinami pagal ligoninėje patvirtintą apžiūros algoritmą, o pacientai, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, buvo suskirstyti į dvi grupes – vaikus, švokščiančius kai peršalę, ir vaikus, švokščiančius kai neperšalę.

Pi^*Z ir Pi^*S alelių dažniai, kurie apskaičiuoti taikant tą patį metodą, ir duomenys tų dažnių palyginimui su LOPL pacientų duomenimis buvo paimti iš Vidurio ir Rytų Europos AAT tinklo, įsteigto pagal LPP Leonardo da Vinci ES programą (2011-1-PL-LEO04-197151) „Geriausios medicininės praktikos standartų diegimas pacientams, sergantiems paveldimu alfa-1 antitripsino deficitu Vidurio Rytų Europoje“. Laikotarpiu nuo 2012 m. spalio mėnesio iki 2013 m. sausio mėnesio buvo paimti 328 LOPL pacientų sauso kraujo lašo mėginiai ir apskaičiuoti šių alelių dažniai 1000-iui alelių. Nustatant Pi^*S ir Pi^*Z alelių dažnį taip pat 1000-iui alelių bendrojoje populiacijoje, duomenys palyginimui buvo paimti iš anksčiau atliktų Lietuvos gyventojų epidemiologinių tyrimų ($N = 2491$) (60, 61).

16.5. Statistinės analizės metodai

Statistinė analizė atlikta naudojant „IBM SPSS Statistics 20.0“ versiją ir „Microsoft Excel 365“. Nuolatiniai ir kategoriniai kintamieji buvo pateikti atitinkamai kaip mediana (tarpkvartilinis intervalas (IQR) ir skaičiai (%).

Nenutrūkstamiems kintamiesiems palyginti naudotas Manno ir Vitnio U arba Friedmano testas, o kategoriniams kintamiesiems palyginti naudotas χ^2 testas arba Fisherio tikslusis testas. Dvipusė p reikšmė $< 0,05$ buvo laikoma reikšminga.

Pi*Z ir Pi*S dažnis išreiškiamas kaip dažnis tūkstančiui alelių su 95 % PI (pvz., iš 74 tiriamųjų, t. y. 148 alelių, rasti 3 Pi*Z aleliai, tada dažnis tūkstančiui alelių apskaičiuojamas taip: $3 \times 1000/148 = 20,27$).

REZULTATAI

17. ALSPAC kohorta

17.1. Tiriamosios grupės charakteristika

ALSPAC kohortoje, pagal klausimyno atsakymus, buvo nustatyti skirtingi švokštimo fenotipai. Pagal tuos fenotipus vaikai pasiskirstė taip: didžiausias vaikų pogrupis buvo niekada švokštimo epizodo nepatyrę vaikai / vienkartinį švokštimo epizodą patyrę vaikai ($n = 5308$, 66,64 %, 3 lentelė). Šiame pogrupyje mergaičių buvo kur kas daugiau nei berniukų. Antras pagal dydį pogrupis buvo ikimokyklinio amžiaus vaikų, kuriems nustatytas protarpinis švokštymas ($n = 1326$, 16,64 %). Vaikų, turinčių likusį švokštimo fenotipą, pasiskirstymas matomas 3 lentelėje.

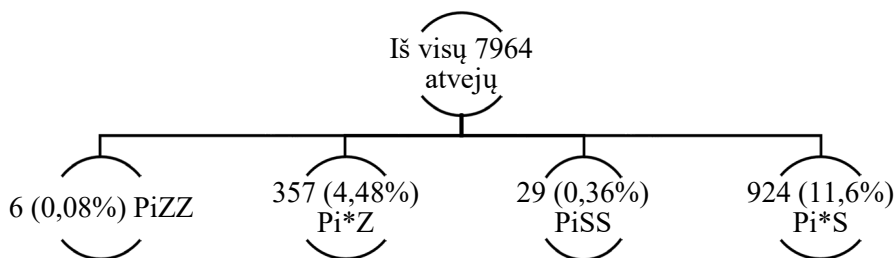
3 lentelė. Švokštimo fenotipų pasiskirstymas tarp vaikų iš ALSPAC kohortos.

Švokštimo fenotipas	Iš viso N	Lytis, N (%)		ŠS (95 % PI) ^a	p reikšmė
		Berniukai	Mergaitės		
Niekada / vienkartinis	5308	2524 (62,1)	2784 (71,4)	0,567 (0,505–0,636)	< 0,001
Ikimokyklinio amžiaus protarpinis (1,5–6 m.)	1326	753 (18,5)	573 (14,7)	1,614 (1,354–1,925)	< 0,001
Vidurio vaikystės protarpinis (4,5–11 m.)	405	256 (6,3)	149 (3,8)	1,962 (1,523–2,527)	< 0,001
Mokyklinio amžiaus išliekantis (8,5–16,5 m.)	222	114 (2,8)	108 (2,8)	0,972 (0,672–1,406)	0,882
Vėlyvos vaikystės išliekantis (≥ 13 –14 m.)	287	163 (4)	124 (3,2)	1,575 (1,169–2,122)	0,002
Nuolatinis (> 6 mėn.)	416	253 (6,2)	163 (4,2)	2,146 (1,651–2,789)	< 0,001
Iš viso	7964	4063 (51,0)	3901 (49,0)		

PI – pasikliautinis intervalas; ŠS – šansų santykis.

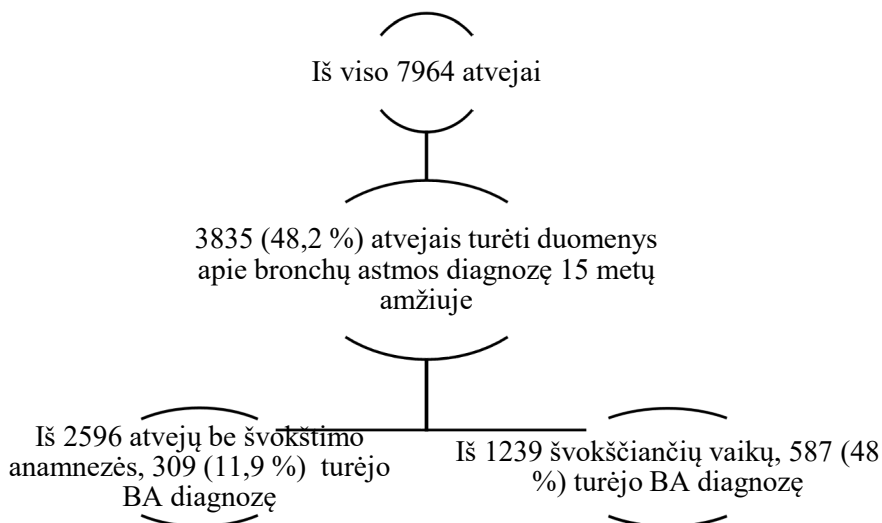
^aŠansų santykis, 95 % pasikliautinis intervalas (Univariate logistic regression, Wald statistic).

Alfa-1 antitripsino genotipų ir mutacinių Pi*Z ir Pi*S alelių pasiskirstymas ALSPAC kohortoje pavaizduotas 5 paveiksle. Šeši iš 7964 (0,08 %) vaikų buvo homozigotiniai ir 357 (4,48 %) heterozigotiniai Pi*Z (rs28929474) AAT genotipai. 29 (0, 36 %) turėjo homozigotinį PiSS ir 924 (11, 6 %) heterozigotinį Pi * S (rs17580) AAT genotipą.



5 paveikslas. Alfa-1 antitripsino genotipų ir mutacinių Pi*Z ir Pi*S alelių pasiskirstymas ALSPAC kohortoje.

Iš visų 7964 atrinktų tiriamųjų 3835 (48,2 %) turėjo duomenis apie bronchų astmos diagnozę 15 metų amžiuje. Šiuos vaikus suskirstėme į dvi grupes: vaikai, kurie neturėjo švokštimo sindromo anamnezėje – 2596 atvejai, ir vaikai, kurių anamnezėje buvo švokštimo sindromas – 1239 atvejai. Toje grupėje, kur nebuvo švokštimo sindromo anamnezės, 309 (11,9 %) vaikams 15 metų amžiuje buvo gydytojo diagnozuota bronchų astma, o grupėje, kurioje buvo švokštimo sindromas anamnezėje, 587 (48 %) vaikams 15 metų amžiuje buvo gydytojo patvirtinta bronchų astmos diagnozė (6 paveikslas).



6 paveikslas. ALSPAC kohortos vaikų pasiskirstymas pagal švokštimo sindromo anamnezės duomenis ir BA diagnozę 15 metų amžiuje.

17.2. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmai tarp bronchų astma sergančių vaikų

Remiantis duomenimis apie gydytojo diagnozuotą bronchų astmą, buvo apskaičiuotas šansų santykis ir rizika sirgti BA, sulaukus 15 metų amžiaus, turint tam tikrą SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmą.

Iš 3835 tiriamųjų, kuriems turėjo duomenis apie gydytojo diagnozuotą bronchų astmą, du polimorfizmai parodė ryšį su vaikų bronchų astma 15 metų amžiuje: heterozigotinis rs17751769 – ŠS 1,273 (1,076–1,506) ($p < 0,05$) ir homozigotinis rs709932 – ŠS 1,710 (1,067–2,742) ($p < 0,05$) (4 lentelė).

4 lentelė. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų pasiskirstymas pagal gydytojo diagnozuotą bronchų astmos diagnozę, sulaukus 15 metų, N=3835

SERPINA1 VNP	Genotipas	N, viso	Gydytojo diagnozuota BA, N (%)	ŠS (95% CI)*	P reikšmė
rs6647	AA	2334	1795 (76.9)	539 (23.1)	
	AG	1305	993 (76.1)	312 (23.9)	1.046 (0.892-1.227)
	GG	196	151 (76.1)	45 (23.0)	0.992 (0.701-1.403)
rs11832	CC	936	711 (76.0)	225 (24.0)	
	TC	1911	1445 (75.6)	466 (24.4)	1.019 (0.848-1.223)
	TT	988	783 (79.3)	205 (20.7)	0.827 (0.667-1.025)
rs17580	TT	3381	2581 (76.3)	800 (23.7)	
	TA	441	346 (78.9)	95 (21.5)	0.885 (0.696-1.126)
	AA	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0.322 (0.041-2.523)
rs709932	CC	2763	2129 (77.1)	634 (22.9)	
	CT	992	757 (76.3)	235 (23.7)	1.042 (0.878-1.237)
	TT	80	53 (66.2)	27 (33.8)	1.710 (1.067-2.742)
rs1243160	GG	2539	1935 (76.2)	604 (23.8)	
	GA	1157	892 (77.1)	265 (22.9)	0.951 (0.807-1.122)
	AA	137	110 (80.3)	27 (19.7)	0.786 (0.511-1.209)
rs2854254	CC	1605	1229 (76.6)	376 (23.4)	
	TC	1718	1298 (75.6)	420 (24.4)	1.057 (0.901-1.240)
	TT	512	412 (80.5)	100 (19.5)	0.793 (0.619-1.015)
rs8004738	AA	950	713 (75.1)	237 (24.9)	
	GA	1913	1453 (76.0)	460 (24.0)	0.952 (0.795-1.140)
	GG	972	773 (79.5)	199 (20.5)	0.774 (0.625-0.959)
rs17751769	GG	1352	1069 (79.1)	283 (20.9)	
	GA	1848	1382 (74.8)	466 (25.1)	1.273 (1.076-1.506)
	AA	635	488 (76.9)	147 (23.1)	1.137 (0.907-1.426)
rs28929470	GG	3792	2906 (76.6)	886 (23.4)	
	GA	42	32 (76.2)	10 (23.8)	1.024 (0.501-2.093)
	AA	1	1 (100.0)	0 (0.0)	NA
rs28929474	CC	3652	2806 (76.8)	846 (23.2)	
	CT	180	131 (72.8)	49 (27.2)	1.240 (0.885-1.737)
	TT	3	2 (66.7)	1 (33.3)	1.658 (0.150-18.311)

*Šsų santykis, 95% pasikliautinis intervalas (Multivariate logistic regression, Wald statistic)

17.3 SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų pasiskirstymas tarp švokštimo fenotipų

Norint nustatyti ryšį tarp švokštimo fenotipų ir SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų, buvo apskaičiuota santykinė rizika sirgti tam tikru švokštimo fenotipu priklausomai nuo SERPINA1 geno VNP.

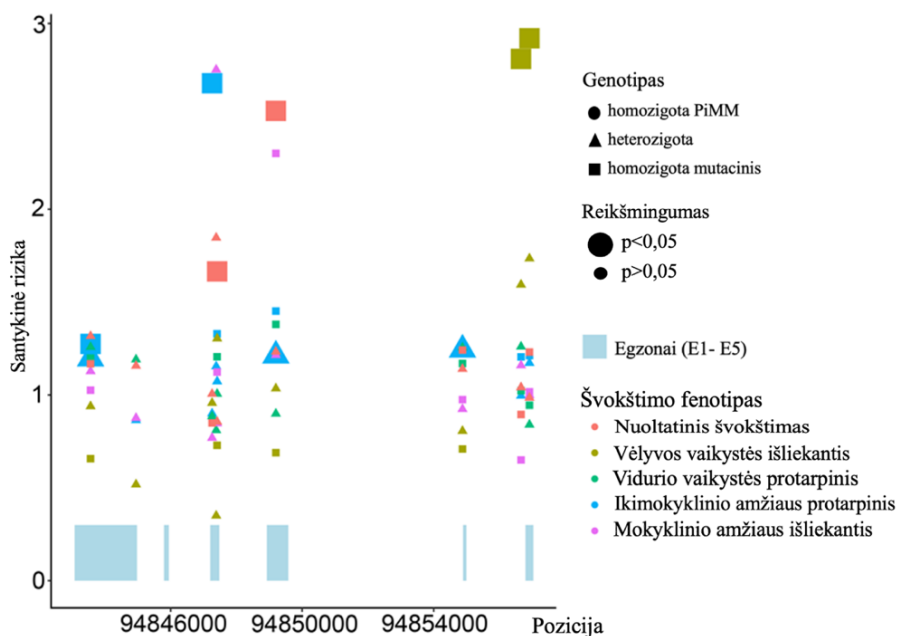
Septyni iš 10 tyrime atrinktų VNP buvo susiję su trimis švokštimo fenotipais: a) rs11832, rs17580 (PiSS), rs709932 ir rs1243160 buvo susiję su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu (pasikartojančiu) švokštimu, kai rizika sirgti šiuo švokštimo fenotipu padidėja nuo 1,2 iki 2,7 karto; b) rs8004738 ir rs17751769 buvo susiję su vėlyvoje vaikystėje prasidėjusiu ir išliekančiu švokštimu ir rizika sirgti šiuo švokštimo fenotipu padidėja beveik 3 kartus (RR – 2,921); c) rs6647 ir rs709932 buvo susiję su nuolatiniu švokštimu, ir rizika padidėja iki 2,5 karto. Neradome VNP, susitelkusių aplink vieną švokštimo fenotipą, bet net keturi VNP buvo susiję su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu (pasikartojančiu) švokštimu (5 lentelė, 7 paveikslas).

5 lentelė. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų pasiskirstymas ir santykinė rizika tarp vaikystės švokštimo fenotipų

SERPINA1 VNPA	Genotipas	Viso		Niekada/vienkartinis švokštimas		Ikimokyklinio amžiaus protarpinis		Vidurio vaikystės protarpinis		Mokyklinio amžiaus išliekantis		Vėlyvos vaikystės išliekantis		Nuolatinis švokštimas					
		N	N	%	N	%	N	RR ^b	N	%	N	RR ^b	N	%	N	RR ^b			
rs6647	AA	4828	3203	66.3	805	16.7	-	243	5.0	-	143	3.0	-	165	3.4	-	269	5.6	-
	AG	2739	1849	67.5	452	16.5	1.073	139	5.1	1.006	67	2.4	0.847	114	4.2	1.304	118	4.3	0.856
	GG	397	256	64.5	69	17.4	1.330	23	5.8	1.206	12	3.0	1.123	8	2.0	0.729	29	7.3	1.665*
rs11832	CC	1927	1304	67.7	311	16.1	-	92	4.8	-	52	2.7	-	75	3.9	-	93	4.8	-
	TC	3962	2598	65.6	667	16.8	1.196*	211	5.3	1.258	115	2.9	1.128	151	3.8	0.939	220	5.6	1.317
	TT	2074	1405	67.7	348	16.8	1.275*	102	4.9	1.198	55	2.7	1.026	61	2.9	0.657	103	5.0	1.168
rs17580	TT	7004	4656	66.5	1171	16.7	-	358	5.1	-	201	2.9	-	254	3.6	-	364	5.2	-
	TA	924	632	68.4	144	15.6	0.900	45	4.9	0.885	21	2.6	0.769	32	3.5	0.957	50	5.4	1.006
	AA	29	15	51.7	10	34.5	2.679*	2	6.9	1.677	0	0.0	0.001	1	3.4	1.656	1	3.4	0.849
rs709932	CC	5744	3861	67.2	943	16.4	-	300	5.2	-	151	2.6	-	198	3.4	-	291	5.1	-
	CT	2068	1354	65.5	357	17.3	1.212*	96	4.6	0.899	64	3.1	1.215	85	4.1	1.035	112	5.4	1.233
	TT	152	93	61.2	26	17.1	1.452	9	5.9	1.380	6	3.9	2.301	5	3.2	0.689	13	8.6	2.530*
rs1243160	GG	5204	3487	67.0	844	16.2	-	263	5.1	-	151	2.9	-	188	3.6	-	271	5.2	-
	GA	2456	1613	65.7	431	17.5	1.244*	129	5.3	1.255	63	2.6	0.924	90	3.7	0.806	130	5.3	1.140
	AA	300	205	68.3	50	16.7	1.222	13	4.3	1.170	8	2.7	0.975	9	3.0	0.709	15	5.0	1.242
rs2854254	CC	3322	2220	66.8	544	16.4	-	185	5.6	-	94	2.8	-	109	3.3	-	170	5.1	-
	TC	3587	2386	66.5	596	16.6	0.937	173	4.8	0.786	97	2.7	1.008	146	4.1	1.272	189	5.3	1.012
	TT	1052	700	66.5	185	17.6	0.968	47	4.5	0.692	31	2.9	1.142	32	3.0	0.948	57	5.4	1.009
rs8004738	AA	2038	1367	67.1	339	16.6	-	115	5.6	-	47	2.3	-	71	3.5	-	99	4.9	-
	GA	3989	2653	66.5	662	16.6	1.172	202	5.1	0.840	124	3.1	0.999	145	3.6	1.735	203	5.1	0.985
	GG	1937	1288	66.5	325	16.8	1.212	88	4.5	0.945	51	2.6	1.017	71	3.7	2.921*	114	5.9	1.231
rs17751769	GG	2693	1807	67.1	451	16.7	-	123	4.6	-	70	2.6	-	92	3.4	-	150	5.6	-
	GA	3890	2580	66.3	633	16.3	0.996	211	5.4	1.260	125	3.2	1.159	140	3.6	1.594	201	5.2	1.041
	AA	1381	921	66.7	242	17.4	1.205	71	5.1	1.023	27	2.0	0.650	55	4.0	2.810*	65	4.7	0.895
rs28929470	GG	7871	5249	66.7	1310	16.6	-	401	5.1	-	216	2.7	-	286	3.6	-	409	5.2	-
	GA	95	58	63.0	16	17.4	1.154	4	4.3	0.810	9	2.5	2.752	1	1.1	0.350	7	7.6	1.847
	AA	1	1	100.0	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.135	0	0.0	0.065	0	0.0	0.029
rs28929474	CC	7600	5058	66.0	1272	16.7	-	383	5.0	-	213	2.8	-	280	3.7	-	394	5.2	-
	CT	357	244	68.3	53	14.8	0.864	22	6.2	1.191	9	2.5	0.876	7	2.0	0.518	22	6.2	1.157
	TT	6	5	83.3	1	16.7	0.795	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001

^a VNP – vieno nukleotido polimorfizmas (single nucleotide polymorphism), ^b SR

– santykinė rizika. Žvaigždute pažymėtos reikšmingos sąsajos su p<0.05.



7 paveikslas. SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmų pasiskirstymas ir santykinė rizika tarp vaikystės švokštimo fenotipų.

Santykinė rizika, kylanti kiekvienam švokštimo fenotipui, pateikiama kaip kiekvieno VNP genominių koordinatės 14 chromosomoje funkcija. Statistiškai reikšmingi VNP ir santykinė rizika (p vertė $< 0,05$) pateikiami kaip dideli simboliai, o kai $p > 0,05$ – maži simboliai. Simboliai nurodo, ar genotipas yra homozigotinis PiMM (normalus variantas), heterozigotinis ar homozigotinis mutacinis. SERPINA1 egzonai (E1–E5) išsidėstę iš dešinės į kairę, pavaizduoti šviesiai mėlyna spalva.

18. *PresWeezAging* LT kohorta

18.1. Pagrindinės ir kontrolinės grupių charakteristika

Pagrindinės lietuviškosios grupės vaikų amžiaus mediana buvo 20,00 (11,00–31,50) mėn., vyravo vyriškoji lytis – 94 (64,8 %) atvejai. Kontrolinėje grupėje vaikų amžiaus vidurkis buvo 53,50 (27,75–69,25) mėn. Reikšmingo skirtumo tarp lyčių nėra: buvo 43 (58,1 %) berniukai ir 31 (41,9 %) mergaitė. Vaikai, kuriems pasireiškė švokštimo epizodai, buvo statistiškai reikšmingai jaunesni nei kontrolinės grupės vaikai. Tyrimo dalyvių charakteristikos pateiktos 6 lentelėje.

6 lentelė. Pagrindinės ir kontrolinės grupių vaikų bendroji charakteristika.

Atvejai	Amžiaus mediana (mėn, IQR)	Amžius (mėn.)		Berniukai N (%)	Mergaitės N (%)
		Min	Max		
Pagrindinė gr.	20,00 (11,00–31,50)	2	66	94 (64,83)	51 (35,17)
Kontrolinė gr.	53,50 (27,75–69,25)	3	72	43 (58,11)	31 (41,89)

N – absoliutus skaičius; IQR – tarpkvartilinės ribos.

Iš 145 vaikų, kuriems diagnozuotas švokštimas, 129 (88,97 %) nustatėme normalų PiMM genotipą, nors vieną Pi*S alelį turinčių buvo 3 (2,07 %), o Pi*Z – 10 (6,90 %) vaikų. Retos mutacijos (*MPlowell*) nustatytos taip pat 3 (2,07 %) atvejais. Tarp kontrolinės grupės vaikų normalus PiMM genotipas buvo rastas 68 (91,89 %) vaikams. Alfa-1 antitripsino genotipų pasiskirstymas pagrindinėje ir kontrolinėje grupėse pateiktas 7 ir 7a lentelėse.

7 lentelė. Alfa-1 antitripsino mutacinių Pi*Z ir Pi*S alelių pasiskirstymas pagrindinėje ir kontrolinėje grupėse.

Tiriamųjų grupė	Iš viso N	PiMM N (%)	Pi*Z N (%)	Pi*S N (%)	Retos N (%)
Pagrindinė grupė	145	129 (88,97)	10 (6,90)	3 (2,07)	3 (2,07)
Kontrolinė grupė	74	68 (91,89)	3 (4,05)	3 (4,05)	0

7a lentelė. Alfa-1 antitripsino genotipų pasiskirstymas pagrindinėje ir kontrolinėje grupėse.

Tiriamųjų grupė	Iš viso N	Pi MM N (%)	PiMZ N (%)	PiMS N (%)	PiZZ N (%)	Retas N (%)
Pagrindinė grupė	145	129 (88,97)	7 (4,83)	3 (2,07)	3 (2,07)	3 (2,07)
Kontrolinė grupė	74	68 (91,89)	3 (4,05)	3 (4,05)	0	0

18.2. Pagrindinės ir kontrolinės grupių klinikinės charakteristikos

AAT koncentracijos mediana tarp pagrindinės ir kontrolinės grupės nesiskyrė: 144 (IQR 119,5–168) mg/dL švokštimo grupėje ir 147,5 (IQR 126–165,25) mg/dL kontrolinėje grupėje, $p = 0,701$. Pagal anketinius duomenis, iš viso

22,1 % švokščiančių vaikų turėjo kliniškai išreikštą alergiją maistui, o 26,9 % sirgo atopiniu dermatitu. Alergijos maistui ir atopinio dermatito paplitimas buvo reikšmingai didesnis pagrindinės grupės švokščiantiems vaikams, palyginti su kontrolinės grupės vaikais (8 lentelė). Rūkymas šeimoje buvo labiau paplitęs pagrindinės grupės vaikų šeimose, palyginti su kontrolinės grupės vaikų šeimomis (33,79 % ir 6,76 %, $p < 0,001$).

8 lentelė. Pagrindinės ir kontrolinės grupės klinikinės charakteristikos.

Kintamasis	Pagrindinė grupė	Kontrolinė grupė	<i>p</i>
AAT koncentracija (IQR), mg/dL	144 (119,5–168)	147,5 (126–166,25)	0,701
Alergija maistui, N (%)	32 (22,07)	1 (1,35)	< 0,001
Teigiamas ODM ar IgE, N (%)	37 (25,52)	3 (4,05)	< 0,001
Alerginis rinitas, N (%)	12 (8,27)	6 (8,11)	0,966
Atopinis dermatitas, N (%)	39 (26,89)	2 (2,70)	< 0,001
Rūkymas šeimoje, N (%)	49 (33,79)	5 (6,76)	< 0,001

Analizuojant anketinius duomenis, pagrindinės grupės tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes: viena grupė – vaikai, kurie kreipėsi į gydymo įstaigą dėl pirmą kartą gyvenime įvykusio švokštimo epizodo, ir kita – vaikai, kurie jau yra kažkada turėję švokštimo epizodą (-ų). Iš 145 pagrindinės grupės vaikų, kuriems kliniškai nustatytas švokštimo sindromas, 59 (40,69 %) patyrė pirmąjį švokštimo epizodą, o 86 (59,31 %) atvyko dėl pasikartojančių epizodų. Vaikai, kuriems pasireiškė pirmasis švokštimo epizodas, įtraukimo į tyrimą metu buvo gerokai jaunesni nei tie, kurių epizodai pasikartoja (atitinkamai 15 (IQR 5–24) mėnesių ir 25 (IQR 12,75–36) mėnesių amžiaus, $p < 0,001$). AAT koncentracijos mediana nesiskyrė tarp vaikų, kuriems pasireiškė pirmasis švokštimo epizodas, ir vaikų, kuriems buvo pasikartojantys švokštimo epizodai. Kur kas didesniai procentai vaikų, kuriems pasireiškė pirmasis švokštimo epizodas, prirėkė hospitalizacijos, palyginti su vaikais, kuriems pasikartojo švokštimo epizodai (91,53 % ir 76,74 %, $p = 0,021$), nors buvimo ligoninėje trukmė nesiskyrė. Kitos klinikinės charakteristikos, tokios kaip švokštimo sunkumas, alergija, rūkymas šeimoje ir gretutinių ligų buvimas, šiuose pogrupiuose reikšmingai nesiskyrė (9 lentelė).

9 lentelė. Vaikų, kuriems pasireiškė pirmasis ir pasikartojantis švokštimo epizodas, klinikinės charakteristikos.

Kintamasis	Vaikai, kuriems buvo pirmas švokštimo epizodas, N = 59	Vaikai, kuriems buvo pasikartojantis švokštimo epizodas, N = 86	<i>p</i>
Amžius (IQR), mėn.	15 (5–24)	25 (12,75–36)	< 0,001
AAT koncentracija (IQR), mg/dl	148 (127–164)	139 (114,75–170)	0,431
Hospitalizacija, N (%)	54 (91,53)	66 (76,74)	0,021
Hospitalizacijos trukmė, dienomis	3 (3–5)	4 (3–5)	0,957
Švokštimas be peršalimo, N (%)	2 (3,39)	23 (26,74)	< 0,001
Lengvas švokštimas, N (%)	13 (22,03)	30 (34,88)	
Vidutinio sunkumo švokštimas, N (%)	28 (47,46)	37 (43,02)	0,215
Sunkus švokštimas, N (%)	18 (30,51)	19 (22,09)	
Alergija maistui, N (%)	11 (18,64)	21 (24,42)	0,410
Teigiamas ODM/IgE, N (%) *	11 (68,75)	26 (52,00)	0,240
Alerginis rinitas, N (%)	3 (5,08)	9 (10,47)	0,361
Atopinis dermatitas, N (%)	14 (23,73)	25 (29,07)	0,476
Rūkymas šeimoje, N (%)	22 (37,29)	27 (31,40)	0,461
Gretutinės ligos, N (%)	33 (55,93)	49 (56,98)	0,901

* N = 66 (kitiems nebuvo atliktas alerginis ištyrimas).

Naudojant anketinius duomenis, tiriamieji taip pat buvo suskirstyti į dvi grupes, kaip pagrindinį požymį imant peršalimą. Peršalimas nustatytas remiantis anamneze, objektyviais tyrimo duomenimis ir tėvų išsakytais skundais (karščiavimas, sloga, kosulys). Objektyvūs apžiūros duomenys buvo įvertinti pagal ligoninės patvirtintą apžiūros algoritmą, o tiriamieji, sergantys švokštimo sindromu, suskirstyti į dvi grupes – vaikai, kuriems švokštimas pasireiškė peršalus, ir vaikai, kuriems švokštimas pasireiškė be peršalimo simptomų. Iš 145 švokščiančių pagrindinės grupės vaikų 25 (17,2 %) patyrė švokštimą be peršalimo simptomų. Vaikai, švokščiantys be peršalimo, buvo gerokai vyresni nei tie, kurie švokštimą patyrė tik peršalę (30 mėnesių (IQR 13,5–52), palyginti su 19 mėnesių (IQR 10–30), $p = 0,009$). AAT

koncentracijos mediana nesiskyrė tarp vaikų, švokščiančių be peršalimo, ir tų, kurie švokščia tik peršalę. Kur kas didesniame procentui vaikų, švokščiančių peršalus, prireikė stacionarinės pagalbos, palyginti su vaikais, švokščiančiais be peršalimo (88,33 % ir 56 %, $p < 0,001$), tačiau buvimo ligoninėje trukmė nesiskyrė. Švokštimo sunkumas tarp vaikų, švokščiančių peršalus, ir tų, kurie švokščia neperšalę, nesiskyrė. Alerginis rinitas, atopinis dermatitas ir rūkymas šeimoje buvo dažnesni tarp vaikų, švokščiančių be peršalimo, palyginti su tais, kurie švokščia tik peršalę (10 lentelė).

10 lentelė. Vaikų, švokščiančių be peršalimo simptomų, ir švokščiančių peršalimo metu, klinikinės charakteristikos.

Kintamasis	Vaikai, švokščiantys neperšalę, N = 25	Vaikai, švokščiantys peršę, N = 120	<i>p</i>
Amžius (IQR), mėn.	30 (13,5–52)	19 (10–30)	0,009
AAT koncentracija (IQR), mg/dl	132 (105,5–151,5)	148 (123,25–169)	0,054
Hospitalizacija, N (%)	14 (56,00)	106 (88,33)	< 0,001
Hospitalizacijos trukmė, dienomis	4.5 (3–7,25)	3 (3–5)	0,063
Lengvas švokštimas, N (%)	8 (32,00)	35 (29,17)	
Vidutinio sunkumo švokštimas, N (%)	12 (48,00)	53 (44,17)	0,785
Sunkus švokštimas, N (%)	5 (20,00)	32 (26,67)	
Alergija maistui, N (%)	6 (24,00)	26 (21,67)	0,798
Teigiamas ODM/IgE, N (%) *	7 (28,00)	30 (25,00)	0,054
Alerginis rinitas, N (%)	7 (28,00)	5 (4,17)	0,001
Atopinis dermatitas, N (%)	11 (44,00)	28 (23,33)	0,034
Rūkymas šeimoje, N (%)	14 (56,00)	35 (29,17)	0,010
Gretutinės ligos, N (%)	12 (48,00)	70 (58,33)	0,343

* N = 66 (kitiems nebuvo atliktas alerginis ištyrimas).

Objektyvios apžiūros metu pagrindinės grupės vaikų švokštimo sunkumas buvo vertinamas naudojant PRAM vertinimo skalę (4 priedas) ir pagal balus, švokštimo sunkumas galėjo būti: lengvas, vidutinio sunkumo arba sunkus. Pagrindinėje švokščiančių vaikų grupėje 43 (29,66 %) vaikams pasireiškė lengvas švokštimas, 65 (44,83 %) – vidutinio sunkumo, o 37 (25,52 %) – sunkus švokštimas. Statistiškai reikšmingo AAT koncentracijos ir AAT alelių

paplitimo skirtumo tarp pacientų grupių, suskirstytų pagal ligos sunkumą, nenustatyta (11 lentelė).

11 lentelė. AAT alelių pasiskirstymas pagrindinėje švokščiančių vaikų grupėje pagal ligos sunkumą.

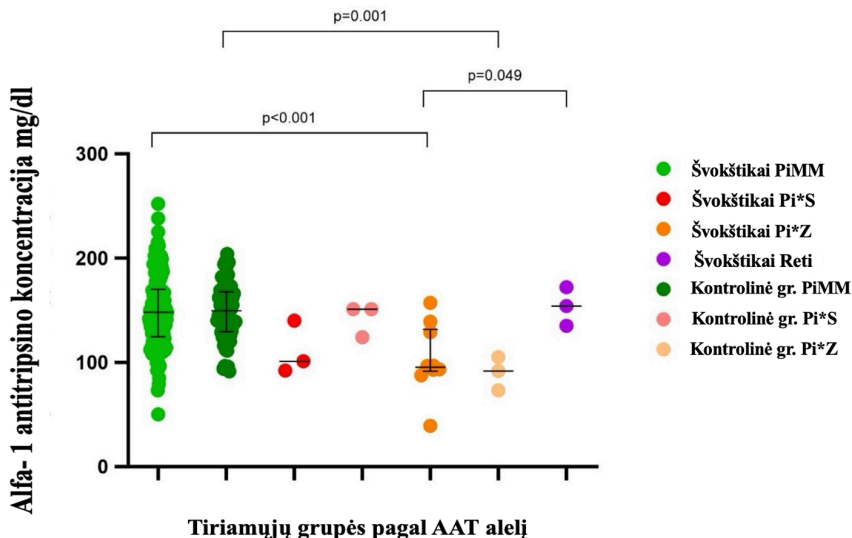
Kintamasis	Lengvas švokštimas	Vidutinio sunkumo švokštimas	Sunkus švokštimas	<i>p</i>
AAT koncentracija (IQR), mg/dL	136 (100–167)	151 (126–185,5)	140 (121–158)	0,129
PiMM, N (%)	38 (29,46)	58 (44,96)	33 (25,58)	n. s.
Pi*S, N (%)	1 (33,33)	1 (33,33)	1 (33,33)	
Pi*Z, N (%)	3 (30,00)	4 (40,00)	3 (30,00)	
Retas, N (%)	1 (33,33)	2 (66,67)	0	–
Iš viso N (%)	43 (29,66)	65 (44,83)	37 (25,52)	

IQR – tarpkvartilinės ribos; n. s. – *non significant*.

Kadangi AAT koncentracija buvo nustatoma visiems lietuviškosios kohortos tiriamiesiems, tiek pagrindinės, švokščiančių, grupės vaikams, tiek kontrolinės grupės vaikams, tai galėjome palyginti koncentracijos skirtumus tarp grupių ir nustatyti, ar pagrindiniai mutacijas lemiantys aleliai turi įtakos AAT koncentracijai. AAT koncentracijos mediana švokščiančių PiMM vaikų grupėje ($n = 129$) buvo 148,00 (IQR 124,5–170) mg/dl, o kontrolinėje grupėje ($n = 68$) – 149,5 (IQR 129,25–167,75) mg/dl. AAT koncentracijos mediana Pi*S alelį turintiems švokščiantiems vaikams ($n = 3$) buvo 101 mg/dl, o kontrolinėje grupėje ($n = 3$) – 151 mg/dl.

AAT koncentracijos mediana Pi*Z alelį turintiems švokščiantiems vaikams ($n = 10$) buvo 95,3 (IQR 91,45–131,5) mg/dl, o kontrolinėje grupėje ($n = 3$) – 91,7 mg/dl. AAT koncentracijos mediana švokščiantiems vaikams, kuriems yra retų mutacijų ($n = 3$), buvo 154 mg/dl.

AAT koncentracija pagrindinėje ir kontrolinėje grupėse, kai yra deficitiniai AAT variantai, parodyta 8 paveiksle.



8 paveikslas. AAT koncentracija plazmoje pagrindinėje ir kontrolinėje grupėse pagal genotipą.

Statistiškai reikšmingo AAT koncentracijos skirtumo tarp pagrindinės ir kontrolinės grupių pagal genotipą nebuvo.

Mūsų gauti duomenys patvirtino žinomą faktą, kad AAT koncentracija yra mažesnė esant deficitiniams Pi*Z ar Pi*S genotipams (8 paveikslas).

18.3. Pi*Z ir Pi*S alelių dažniai, palyginti su kitomis kohortomis

Pi*Z ir Pi*S alelių dažnių palyginimui buvo pasirinktos skirtingos tiriamųjų grupės iš skirtingų kohortų. Mūsų tiriamųjų Pi*Z ir Pi*S alelių dažniai 1000-iui alelių buvo palyginti su LOPL sergančių pacientų Pi*Z ir Pi*S alelių dažniais bei su ankstesnių epidemiologinių tyrimų, atliktų su Lietuvos gyventojais Pi*Z ir Pi*S alelių dažniais. Alelių dažniai apskaičiuoti taikant tą patį metodą. Nustatyta, kad Pi*Z alelis statistiškai reikšmingai dažniau paplitęs tarp Lietuvos švokščiančių vaikų nei tarp Lietuvos nespecifinių epidemiologinių tyrimų asmenų.

Pi*S ir Pi*Z alelių dažnis tūkstančiui alelių tarp švokščiančių vaikų yra artimas šių alelių dažniui tarp LOPL sergančių pacientų: Pi*S 10,3 (95 % PI: 4,0–16,6) vs 15,8 (95 % PI: 6,92–24,6) ir Pi*Z 44,8 (95 % PI: 32,1–57,5) vs 46,1 (95 % PI: 31,1–60,9).

Pi*Z alelis pagrindinėje švokščiančių vaikų grupėje reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės grupės alelio – 44,8 (95 % PI: 32,1–57,5) vs 20,27 (95 % PI: 11,53–29,01). Ir priešingai, nors skirtumas nėra statistiškai reikšmingas, kontrolinėje grupėje rasta daugiau Pi*S alelio variantų nei pagrindinėje grupėje – 20,27 (95 % PI: 11,53–29,01) vs 10,3 (95 % PI: 4,0–16,6) (12 lentelė).

12 lentelė. Pi*Z ir Pi*S alelių dažnio skirtumai tarp pagrindinės grupės švokščiančių vaikų, kontrolinės grupės, LOPL pacientų iš Vidurio ir Rytų Europos AAT tinklo ir Lietuvos nespecifinės populiacijos grupės.

Aleliai	Alelių dažnis 1000-iui alelių (95 % PI)			
	Pagrindinė grupė	Kontrolinė grupė	LOPL pacientai	LT nespecifinės populiacijos grupė
Pi*Z	44,8 (95 % PI: 32,1–57,5)	20,27 (95 % PI: 11,53–29,01)	46,1 (95 % PI: 31,1–60,9)	13,6 (95 % PI: 10,7–17,4)
Pi*S	10,3 (95 % PI: 4,0–16,6)	20,27 (95 % PI: 11,53–29,01)	15,8 (95 % PI: 6,92–24,6)	15,6 (95 % PI: 12,5–19,6)

PI – pasikliautinis intervalas.

18.4. Tikėtinas alfa-1 antitripsino deficitą lemiančių genotipų dažnis

Įvertinus dažniausių patologinių AAT alelių PI*S ir PI*Z dažnį, pagal *Hardy* ir *Weinbergo* dėsnį apskaičiuotas tikėtinas penkių dažniausių AAT deficitą lemiančių genotipų PIMZ, PIZZ, PIMS, PISS, PISZ dažnis vaikams, kuriems yra švokštimo sindromas (13 lentelė).

13 lentelė. Tikėtinas vaikų, kuriems yra švokštimo sindromas, alfa-1 antitripsino deficitą lemiančių genotipų dažnis, apskaičiuotas pagal Hardy ir Weinbergo dėsnį.

Alelių dažnis		Tikėtinas genotipų dažnis (1/iš)				
PI*Z (95 % PI)	PI*S (95 % PI)	MZ	ZZ	MS	SS	SZ
44,8 (95 % PI: 32,1–57,5)	10,3 (9 5% PI: 4,0–16,6)	1/12	1/498	1/52	1/9344	1/1078

Kadangi tiriamojoje, švokščiančių vaikų, grupėje nustatyti trys genotipai su mutacijomis: PiMZ, PiZZ ir PiMS, palyginus tuos tris tikėtiną ir nustatytą AAT deficitą lemiančių genotipų dažnius švokščiantiems vaikams, rasta, kad nustatytas PIZZ genotipo dažnis yra gerokai didesnis nei tikėtinas ($\chi^2 = 24,3$, $p < 0,05$) (14 lentelė). Nerasta statistiškai patikimo skirtumo tarp nustatyto ir tikėtino PIMZ ir PIMS genotipų dažnių.

14 lentelė. Atitikties tarp tikėtino ir nustatyto alfa-1 antitripsino genotipų skaičiaus pagrindinės grupės švokščiantiems vaikams įvertinimas.

Švokščiančių vaikų, turinčių atitinkamą AAT deficitą lemiantį genotipą, skaičius	PiMZ	PiZZ	PiMS
Nustatytas (S) (n = 145)	7	3	3
Tikėtinas (T) (n = 145)	1/12	1/498	1/52
$\frac{(S-T)^2}{T}$	2,08	24,3	2,8
Pearsono χ^2 ,	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P > 0,05$

REZULTATŲ APTARIMAS

Remiantis literatūros duomenimis, galima teigti, kad vaikystės švokštimo sindromas yra susijęs su padidėjusia LOPL išsivystymo rizika suaugus (161, 163, 230). Ši ryšį gali lemti keli veiksniai. Pavyzdžiui, vaikai, sergantys švokštimo ligomis, gali būti jautresni aplinkos veiksniams, tokiems kaip tabako dūmai, oro tarša ir kvėpavimo takų infekcijos (231–233). Nuolatinis uždegimas dėl pasikartojančių švokštimo epizodų gali sukelti struktūrinius plaučių pokyčius, įskaitant kvėpavimo takų remodeliavimąsi ir sumažėjusį elastingumą, kurie yra pagrindiniai LOPL vystymosi požymiai.

Apskritai vaikų švokštimo ir suaugusiųjų LOPL ryšys pabrėžia ankstyvo vaikų kvėpavimo takų problemų nustatymo ir valdymo svarbą, kad būtų galima sušvelninti ilgalaikius neigiamus padarinius plaučių sveikatai.

Norėdami tikslinti duomenis apie AATD daroma įtaką vaikų kvėpavimo takams ir ryšį su vėlesniame amžiuje pasireiškiančia LOPL, pasirinkome dvipakopį analizės metodą, kai viena kohorta buvo populiacinė (ALSPAC), o kita tiriamųjų grupė – tikslinė, vaikams buvo nustatytas švokštimo sindromas. Mes iškėlėme bendrą hipotezę abiemis kohortoms, kad tam tikras švokštimo fenotipas, kaip antai pre-LOPL endotipas, faktiškai yra pirmasis klinikinis LOPL, iki tol laikytos išimtinai pagyvenusių suaugusiųjų liga, manifestavimas ankstyvoje vaikystėje. Tyrimų tikslai abiemis kohortoms yra skirtingi, patys tiriamieji taip pat heterogeniški, bet rezultatai kartu apima bendrą išvadą ir parodo visą hipotezės vaizdą.

Mes iškėlėme hipotezę, kad tarp SERPINA1 geno polimorfizmų, švokštimo sindromo fenotipų ir tarp bronchų astmos išsivystymo rizikos yra ryšys. Genotipų, kai yra mutacijų, atvejais alfa-1 antitripsino koncentracija kraujo plazmoje yra sumažėjusi, o tai turi įtakos ūminio švokštimo epizodo klinikiniam sunkumui. Taip pat kad AAT mutacinių Pi*Z ir Pi*S alelių dažnis švokščiančių vaikų grupėje yra didesnis nei bendrojoje populiacijoje ir panašus į dažnį LOPL sergančių suaugusiųjų grupėje.

Dauguma studijų atlikta tiriant alfa1 antitripsino koncentraciją ir AATD mutacinius variantus, taip pat jų ryšį su bronchų astma, emfizema ir LOPL, taigi tiriamosios grupės – suaugusieji, turintys kvėpavimo takų obstrukcijos simptomų. Lietuvoje taip pat yra atliktas ne vienas tyrimas, kurio tikslas buvo įvertinti AAT geno dažnį bei paplitimą ir nustatyti AAT trūkumo atvejus didelėje Lietuvos pacientų, sergančių LOPL, kohortoje. Nors tikslinga tikrinti AAT koncentraciją pacientams, turintiems problemų su kvėpavimo takų pažeidimais, tokiais kaip LOPL ir emfizema, šis metodas reiškia, kad greičiausiai praleisime besimptomius ar ikisimptomius asmenis, t. y. tuos,

kuriems baltymo koncentracija nepakitusi, bet yra sutrikusi funkcija. Panašu, kad būtent AAT koncentracijos ryšys su klinicine eiga ir ligos sunkumu nėra toks reikšmingas, nes mūsų *PresWheezeLT* vaikų grupėje radome, kaip ir nurodo literatūros šaltiniai, kad AAT koncentracija priklauso nuo genotipo, tačiau klinicinei ligos eigai įtakos neturėjo. Koncentracija atitinka genotipą: Pi*Z genotipo atvejais koncentracija statistiškai reikšmingai skiriasi nuo PiMM: 95,3 (IQR 91,45–131,5) mg/dl vs 148,00 (IQR 124,5–170) mg/dl, tačiau neradome statistiškai patikimo ryšio tarp AAT koncentracijos ir švokštimo sunkumo. Nors neradome ryšio tarp genotipų, lemiančių mutacijas, ir švokštimo sunkumo, tačiau manome, kad tai yra dėl jauno tiriamųjų amžiaus, kol dar organizmas sugeba visiškai kompensuoti AAT trūkumą ar disfunkciją ir, žinoma, dar nėra taip paveiktas išorinių rizikos veiksnių.

Kita vertus, vaikai dėl šio baltymo trūkumo ar jo disfunkcijos tirti dar mažiau nei suaugusieji. Kiek daugiau nagrinėti duomenys ir ryšys tarp AAT koncentracijos serume ir genotipo asociacijų su bronchų astma, tačiau šie duomenys skirtingi ir kontroversiški. Vieni tyrimai rodo, kad bronchų astma sergančių vaikų grupėse yra padidėjęs PiZ ar PiS alelių dažnis (185, 186, 234), o kiti tyrimai pateikia duomenis, kad ryšio tarp PiZ ar PiS alelių ir bronchų astmos nėra arba jis silpnas (179, 235). Mūsų dabartiniai rezultatai rodo, kad Pi*Z alelio dažnis tarp Lietuvos švokščiančių ikimokyklinio amžiaus vaikų yra gerokai didesnis nei kontrolinėje grupėje (atitinkamai 44,8 [95 % PI: 32,1–57,5] ir 20,27 [95 % PI: 11,53–29,01]). Be to, Pi*Z alelio paplitimas tarp šių vaikų (44,8 alelio 1000 alelių) yra didesnis, palyginti su bendrais populiacijos įverčiais, remiantis duomenimis iš 21 Europos šalies (89, 108).

Įdomu, kad kontrolinėje grupėje radome daugiau Pi*S variantų nei pagrindinėje švokščiančių vaikų grupėje. Šis pastebėjimas gali būti susijęs su tuo, kad kontrolinėje grupėje pagrindinės patologijos, dėl kurių prireikė operacijų, buvo tokios būklės kaip pilvo sienos ir kirkšnies išvaržos (52,7 %), portveino dėmės (14,9 %), gerybiniai navikai (8,1 %), kraujagyslių malformacijos (8,1 %), cistiniai dariniai (6,8 %), hemorojiniai mazgai (2,7 %) ir kiti pavieniai atvejai (6,8 %). Gali būti, kad šios patologijos yra susijusios su AATD, nes AAT yra pagrindinis neutrofilų proteazių ir tam tikrų metaloproteazių, dalyvaujančių jungiamojo audinio remodeliacijoje ir atkūrimo, inhibitorius. Šis ryšys galėtų paaiškinti didesnę Pi*S variantų paplitimą kontrolinėje grupėje (58, 236).

Taip pat palyginome Pi*S ir Pi*Z alelių dažnio tarp švokščiančių vaikų duomenis su anksčiau pateiktais duomenimis apie šių alelių dažnį tarp LOPL sergančių pacientų, gautais iš Vidurio ir Rytų Europos AAT tinklo ir Lietuvoje atliktų nespecifinių epidemiologinių tyrimų (237, 238). Pi*S ir Pi*Z alelių dažnis tarp švokščiančių vaikų buvo panašus į dažnį, aptiktą tarp LOPL

sergančių pacientų: PiS 10,3 % (95 % PI: 4,0–16,6) vs 15,8 % (95 % PI: 6,92–24,6) ir PiZ 44,8 % (95 % PI: 32,1–57,5) vs 46,1 % (95 % PI: 31,1–60,9). Be to, Pi*Z alelis buvo gerokai dažnesnis švokščiantiems vaikams, palyginti su duomenimis, gautais iš epidemiologinių tyrimų, nesusijusių su konkrečia liga, – 44,8 % (95 % PI: 32,1–57,5), palyginti su 13,6 % (95 % PI: 10,7–17,4).

Sunku palyginti įvairių tyrimų duomenis dėl tiriamųjų grupių ir įtraukimo kriterijų įvairovės. Tačiau yra ir ilgalaikių studijų, kurios tęsiasi daugiau nei 40 metų. Pavyzdžiui, remiantis Švedijos naujagimių atrankinės patikros duomenimis (1972–1974 m.), skirtingais laiko momentais rezultatai, priklausomai nuo tiriamųjų sulaukto amžiaus, kito. Štai nuo naujagimių patikros praėjus maždaug 22 metams, atliktame tyrime gaunami rezultatai, kad jaunų suaugusiųjų (22 metų), turinčių Pi*Z alelį, plaučių funkcija iš esmės normali, tačiau bronchų astmos simptomų dažnis yra didelis. Šių asmenų rūkymas yra susijęs su padažnėjusiais kvėpavimo takų simptomais (176). Dar po kelerių metų, vėl ištyrus tuos pačius asmenis, kuriems jau maždaug 30 metų, nustatyta, kad plaučių funkcija yra normali nerūkantiems, bet PiZZ rūkančiųjų plaučių funkcija pakito, o tai gali būti ankstyvos emfizemos požymiai (239). Toliau stebint šiuos tiriamuosius, nustatyta, kad PiZZ rūkaliai turėjo LOPL požymių dar iki 40 metų amžiaus (240). Sulaukus 42 metų, nuolat rūkantiems PiZZ asmenims atsiranda neabejotini LOPL požymiai, o PiZZ niekada nerūkusiems – ankstyvi fiziologiniai emfizemos požymiai (241).

ALSPAC grupės vaikams ištyrėme galimą ryšį tarp SERPINA1 VNP ir diagnozuotos bronchų astmos sulaukus 15 metų. Iš 10 tirtų VNP heterozigotinis rs17751769 ir homozigotinis rs709932 turėjo tvirtiausią ryšį su paauglių amžiaus bronchų astma. Nei Pi*Z (rs28929474), nei Pi*S (rs17580) variantai neparodė statistiškai reikšmingo ryšio su bronchų astma tiriamojoje grupėje.

Kalbant apie bronchų astmą, yra žinoma, kad daugeliui vaikų, kuriems švokštimas pasireiškia ikimokykliniame amžiuje, mokykliniame amžiuje išsivysto atopinė alerginė astma (180).

Šiam teiginiui taip pat neprieštaruoja mūsų ALSPAC kohortos gauti rezultatai, nes vaikams, kuriems anamnezėje ir ikimokykliniame amžiuje pasireiškė švokštimo sindromas, sulaukus 15 metų net 48 % (587 iš 1239) buvo gydytojo diagnozuota bronchų astma, palyginti su tais, kurie neturėjo švokštimo anamnezėje (11,9 %).

Tačiau į šį procentą įeina bendrai visi vaikai, kuriems nustatytas švokštimo sindromas, o yra labai svarbu atsižvelgti ir į švokštimo fenotipą. Literatūros duomenimis, nuolatinio švokštimo fenotipai (mokykliniame amžiuje prasidėjęs, vėlai prasidėjęs ir nuolatinis) yra susiję su vėlesne bronchų astmos

diagnoze (168). Nepaisant to, virusinės infekcijos ar aplinkos poveikis ne visiems vaikams sukelia švokštimo ligą arba ne visais atvejais švokštimas baigiasi bronchų astma (171, 181, 182), o tai rodo, kad genotipas vaidina svarbų vaidmenį.

Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai rodo, kad septyni iš 10 atrinktų VNP buvo susiję su trimis švokštimo fenotipais: a) rs11832, rs17580, rs709932 ir rs1243160 buvo susiję su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu švokštimu; b) rs8004738 ir rs17751769 buvo susiję su vėlyvoje vaikystėje prasidėjusiu nuolatinio švokštimu; c) rs6647 ir rs709932 buvo susiję su nuolatinio švokštimo. Neradome, kaip tikėjomės, VNP, susitelkusių aplink vieną nuolatinį švokštimo fenotipą, nors keturi VNP buvo susiję su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu švokštimu.

Stipriausios asociacijos santykinė rizika ne mažiau kaip 2,5 buvo homozigotiniams rs17580 (PiSS), homozigotiniams rs8004738 ir homozigotiniams rs17751769 polimorfizmams. Mūsų analizėje homozigotinis rs17580 (PiSS) buvo susijęs su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu švokštimu. Panašius duomenis skelbė ir Colp su bendraautoriais. Jie nustatė padidėjusį šių AAT alelių (Pi*S arba Pi*Z) paplitimą bronchų astma sergantiems Puerto Riko vaikams (242). Tačiau, kaip minėta anksčiau, apskritai trūksta publikuotų duomenų apie homozigotinio Pi*S alelio paplitimą ir poveikį vaikų švokštimo sindromui ir bronchų astmai.

Mūsų tyrimo metu rasta, kad vėlyvoje vaikystėje atsiradęs nuolatinis švokštimas, kuris susijęs su rs17751769 polimorfizmu, gali būti atsakingas ir už bronchų astmos išsivystymą, nes mūsų tiriamojame ALSPAC kohortoje jo heterozigotinis variantas buvo susijęs su bronchų astma (ŠS 1,273 (1,076–1,506)), o homozigotinis variantas susijęs su vėlyvuuoju vaikystėje atsirandančiu nuolatinio švokštimu (SR 2,810, $p < 0,05$). Taigi neatmetama tikimybė, kad šis polimorfizmas yra atsakingas už vėlyvoje vaikystėje prasidėjusį švokštimo fenotipą bei ligos manifestaciją į bronchų astmą.

Taip pat rastas vėlyvoje vaikystėje prasidėjusio ir išliekančio švokštimo ryšys su rs17751769 bei rs8004738 VNP leidžia įtarti asociaciją tarp šių švokštimo fenotipų ir LOPL. rs8004738 buvo vienas iš penkių pagrindinių polimorfizmų, kuris buvo įtrauktas prie haplotipo analizės, siekiant nustatyti riziką sirgti LOPL. Buvo nustatyta, kad jis yra susijęs su reikšmingu LOPL rizikos padidėjimu (nuo 6 iki 50 kartų), kuris dar labiau padidėja rūkant (243). O Fujimoto ir kt. ieškojo ryšio tarp atitinkamų polimorfizmų ir emfizemos, tačiau jokių ryšių tarp šių rs8004738, rs11832, rs709932 polimorfizmų ir emfizemos nerado (244).

Nenustatėme, kad rs28929474 (Pi*Z) būtų susijęs su kuriuo nors iš švokštimo fenotipų. Panašiai ir von Ehrenstein ir kt. nenustatė, kad PiMZ didintų bronchų astmos riziką didelėje moksleivių grupėje, tačiau susiejo

mažą AAT koncentraciją su padidėjusiu kvėpavimo takų hiperreaktyvumu ir pablogėjusia plaučių funkcija (245). Homozigotų rs28929474 (PiZZ) rizika susirgti LOPL yra didesnė (246), o heterozigotų (PiMZ) rizika, skaitant atskiras publikacijas, nesutampa (247). Tačiau metaanalizės rezultatai rodo, kad atvejų ir kontrolės tyrimų duomenimis, tinkamai pakoregavus pagal amžių ir rūkymo kovariacinius rodiklius, nustatytas didesnis emfizemos atvejų dažnis ir prastesnė plaučių funkcija PiMZ grupėje nei PiMM populiacijoje. Kadangi emfizema kiekybiškai įvertinama neatsižvelgiant į spirometrinius kintamuosius ir yra susijusi su mirtingumu nuo AAT trūkumo, o plaučių funkcija – ne, šių tyrimų pakanka įrodyti padidėjusią LOPL riziką PiMZ tiriamiesiems (248).

Vaikų švokštimo fenotipai galbūt atspindi grupę pataloginių vienetų, kai yra skirtinga pagrindinė patologija, apimanti uždegiminius kelius, kuriuos veikia AAT. AAT funkcijos sutrikimai gali lemti prouždegiminį foną ir didesnę ankstyvo simptomų pasireiškimo ir užsitęsimo riziką (32, 249, 250).

Mūsų išvados rodo, kad SERPINA1 polimorfizmai turi įtakos ikimokyklinio amžiaus protarpiniam, vėlyvoje vaikystėje prasidėjusiam ir išliekančiam bei nuolatiniam švokštimui.

Pagrindinis veiksnys, lemiantis LOPL ir emfizemos išsivystymą esant AAT trūkumui, yra pirminės AAT funkcijos – neutrofilų elastazės slopinimo – sutrikimas. AAT atlieka ir daug kitų funkcijų, pavyzdžiui, slopina neutrofilų sukibimą, mažina IL-1 kiekį, netiesiogiai veikia eozinofilų funkciją ir histamino išsiskyrimą (249–251). Be to, tam tikri haplotipai, pagrįsti dešimčia SERPINA1 geno VNP, nuo 5 iki 60 kartų padidina LOPL riziką (243). Tai rodo, kad AAT sutrikimas molekulinio lygmeniu gali turėti įtakos ne tik gebėjimui slopinti proteazes, bet ir poveikiui imuninei sistemai bei uždegimo moduliacijai – tai gali paaiškinti AAT įtaką vaikų švokštimui.

Vienas iš pagrindinių mūsų tyrimo pranašumų – didelė imtis, reprezentatyvumas ir duomenų rinkimo dažnumas. Apie švokštimą ALSPAC grupėje buvo pranešama beveik kasmet (252). Nepaisant didelio dalyvių skaičiaus, ALSPAC kohorta gali būti nepakankama analizuojant retesnius VNP, tokius kaip rs28929474. Kitas ribotumas yra tas, kad neanalizavome rizikos veiksnių, tokių kaip motinos rūkymas nėštumo metu, ankstyvasis rūkymo poveikis, namų ūkio ir aplinkos teršalų poveikis – visi šie veiksniai turi įtakos su AAT susijusios LOPL (253) ir moksleivių plaučių funkcijos vystymuisi (254). Motinos rūkymas nėštumo metu buvo ikimokyklinio ir vidurinio amžiaus vaikų besitęsiančio ir nuolatinio švokštimo rizikos veiksnys, o dūmų poveikis pirmaisiais gyvenimo metais – ne (255).

Neanalizavome rūkymo poveikio nėštumo metu, aplinkos veiksnių poveikio ir pasyvaus rūkymo kaip rizikos veiksnio. Nors *PresWheezeLT*

kohortoje radome, kad rūkymas šeimoje buvo labiau paplitęs pagrindinės grupės švokščiančių vaikų šeimose, palyginti su kontrolinės grupės (33,79 % ir 6,76 %, $p < 0,001$). Spėjame, kad pastarieji du veiksniai gali turėti įtakos švokštimui per ilgesnį laikotarpį, todėl jie gali pasireikšti vėlyvuju švokštimu vaikystėje. Galiausiai, mes pateikiame tik vienos gimusių vaikų kohortos rezultatus ir šie rezultatai nebuvo pakartoti kitoje populiacijoje. Be to, švokštimo apibrėžimas vaikystėje susiduria su trimis skirtingomis problemomis: netikslumu apibrėžiant švokštimo simptomą, švokštimo heterogeniškumu pirmaisiais šešeriais gyvenimo metais ir apsunkintu bronchų astmos diagnozavimu ikimokykliniame amžiuje. Tai gali reikšti, kad švokštimas yra skirtingų pagrindinių mechanizmų rezultatas, o tai apsunkina klinikinius ir molekulinis tyrimus.

Daugelio SERPINA1 geno polimorfizmų vaidmuo vis dar menkai žinomas. AAT mutacinių variantų ilgalaikio poveikio obstrukcinėms plaučių ligoms, ypač kai liga pasireiškia su AAT susijusia LOPL, taip pat SERPINA1 geno sąveikos su kitais genetiniais ir aplinkos veiksniais analizė papildytų mūsų žinias apie šį baltymą ir jo vaidmenį kvėpavimo takų sveikatai bei vaikų švokštimo, bronchų astmos ir LOPL vystymuisi.

Remiantis mūsų gautais rezultatais, SERPINA1 geno vieno nukleotido polimorfizmai yra susiję su vaikų švokštimo išsivystymu ir nėra susiję su AAT trūkumu. Atrodo, kad ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimas yra tikslinis fenotipas, kuriam būdinga padidėjusi su AAT susijusi LOPL rizika suaugus. Vėlyvojoje vaikystėje atsirandantis nuolatinis ir tęstinis švokštimas taip pat yra potencialūs fenotipai, lemiantys didesnę LOPL riziką.

Apibendrinant mūsų kohortos, mažų vaikų, kuriems buvo diagnozuotas švokštimo sindromas, duomenis, galima teigti, kad būtina tikrinti AAT heterozigotinių mutacijų vaidmenį švokštimo pasireiškimui ir tolesniam LOPL vystymuisi. Supratimas, kaip šios genetinės variacijos prisideda prie ankstyvųjų kvėpavimo takų problemų, gali suteikti vertingų žinių tiek apie vaikų švokštimo, tiek apie suaugusiųjų LOPL vystymosi mechanizmus.

Ištyrę didesnes ir įvairesnes grupes, mokslininkai galės geriau nustatyti konkretų heterozigotinių AAT mutacijų poveikį kvėpavimo takų sveikatai. Tai reiškia, kad reikia suprasti, kaip šios mutacijos veikia AAT kiekį ir plaučių funkciją ankstyvame amžiuje. Be to, ankstyvas AAT mutacijų turinčių vaikų identifikavimas leistų imtis priemonių, kuriomis būtų užkirstas kelias švokštimo progresavimui į sunkesnes kvėpavimo takų ligas.

IŠVADOS

1. Penki iš 10 SERPINA1 geno polimorfizmų susiję su ikimokyklinio amžiaus vaikų švokštimo fenotipais, atitinkamai: rs11832, rs17580 (PiSS), rs709932 ir rs1243160 su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu (pasikartojančiu) švokštimu, o rs6647 ir rs709932 su anksti prasidėjusiu nuolatinio švokštimu. PiSS genotipą turintiems vaikams protarpinio (pasikartojančio) švokštimo rizika ikimokykliniame amžiuje yra viena iš didžiausių ir skiriasi nuo bendros populiacijos daugiau kaip 2.5 karto.
2. SERPINA1 geno polimorfizmai rs8004738 ir rs17751769 yra susiję su vaikystėje prasidėjusiu nuolatinio švokštimu o rs17751769 ir rs709932 su paauglių amžiuje gydytojo diagnozuota bronchų astma, tačiau nei vienas iš 4 SERPINA1 polimorfizmų, turinčių ryšį su ikimokyklinio amžiaus protarpiniu (pasikartojančiu) švokštimu, nesusijęs su mokyklinio amžiaus bronchų astma.
3. Pi*Z* ir Pi*S alelių dažnis Lietuvos švokščiančių ikimokyklinio amžiaus vaikų grupėje sudaro atitinkamai 44,8 alelius 1000-iui alelių (95 % CI: 32,1–57,5) ir 10,3 alelius 1000-iui alelių (95 % CI: 4,0–16,6), ir yra reikšmingai didesnis, palyginti su dažniu vaikų be kvėpavimo obstrukcinių ligų grupėje ir artimas šių alelių dažniui LOPL sergančių suaugusiųjų grupėje. Retos mutacijos tarp švokščiančių ikimokyklinio amžiaus vaikų sudaro 2,07 %.
4. Alfa-1 antitripsino Pi*Z alelį turintiems ir švokštimo sindromu sergantiems ikimokyklinio amžiaus vaikams ūminės kvėpavimo takų obstrukcijos epizodo metu alfa-1 antitripsino koncentracija reikšmingai sumažėja, tačiau koncentracijos sumažėjimas šiame amžiuje nesukelia sunkesnio kvėpavimo funkcijos sutrikimo.
5. AAT genotipų variantai reikšmingi tiek mokyklinio amžiaus bronchų astmos, tiek ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos etiopatogenezeje. Heterogeninėje švokštikų kohortoje galima išskirti LOPL fenotipą, kurį galėtume vertinti ne tik kaip LOPL prognostinį faktorių, bet ir kaip iki tol išimtinai suaugusiųjų amžiuje diagnozuojamos ligos klinikinę išraišką ankstyvoje vaikystėje.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Vaikai, kuriuos vargina pasikartojantys (3 ir daugiau) švokštimo epizodai, kad ir kokio būtų amžiaus, turėtų būti tiriami dėl alfa-1 antitripsino deficito tiek nustatant alfa-1 antitripsino koncentraciją, tiek atliekant fenotipavimą, nes tai gali turėti įtakos švokštimo sindromo eigai, taip pat sergamumui bronchų astma paauglystėje ir lėtine obstrukcine plaučių liga suaugusiųjų amžiuje.
2. Vaikai, kuriems nustatytas alfa-1 antitripsino genotipas su bent vienu Pi*Z aleliu, turėtų būti dispanserizuojami ir stebimi gydytojo vaikų pulmonologo, periodiškai vertinant išorinio kvėpavimo funkciją ir stebint dėl specifinių kepenų ir odos pažeidimų.
3. Šeimos vaikų, kuriems nustatytas alfa-1 antitripsino genotipas, lemiantis mutaciją, turėtų žinoti kvėpavimo obstrukcinėms ligoms specifinės profilaktikos reikalavimus, kaip antai aktyvaus ir pasyvaus rūkymo, įskaitant elektronines cigaretes, visiško eliminavimo, namų ir ugdymo įstaigų oro taršos kontrolės, ir jų laikytis.
4. Siūlyti įtraukti alfa-1 antitripsino deficito genotipo tyrimą į Lietuvos naujagimių visuotinės patikros programą.

DARBO TĘSTINUMAS

Alfa-1 antitripsino deficitas yra nepakankamai diagnozuojamas sutrikimas, epidemiologiniai duomenys skirtingi, mūsų krašte genotipų, kai yra mutacija, paplitimas didelis, ir su šiuo sutrikimu susiję pažeidimai tam tikra prasme priklauso nuo amžiaus, todėl labai svarbus ilgalaikis tokių pacientų stebėjimas ir išsamesnės žinios apie klinikinę ligos eigą, rizikos faktorius bei galimą profilaktiką ir gydymą. Kohortiniai tyrimai yra ypatingai svarbūs, siekiant įvertinti nuo amžiaus priklausomų ligų etiologiją ir natūralią eigą, mokantis atpažinti ir įvardinti ankstyvuosius lėtinių ligų požymius, darančius esminę neigiamą įtaką sveikam senėjimui. Todėl tikslinga tęsti PresWeezAging LT kohortos stebėjimą vaikų ir suaugusiųjų amžiuje, susiejant mūsų duomenis su tartautiniu AATD registru ir ieškant sąsajų ne tik su kvėpavimo takų, bet taip pat ir su kitomis lėtinėmis ligomis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Visser CAN, Garcia-Marcos L, Eggink J, Brand PLP. Prevalence and risk factors of wheeze in Dutch infants in their first year of life. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Feb; 45(2): 149–56.
2. Wolters AAB, Kersten ETG, Koppelman GH. Genetics of preschool wheeze and its progression to childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2024 Jan; 35(1): e14067.
3. Van Der Valk RJP, Duijts L, Kerkhof M, Willemsen SP, Hofman A, Moll HA, et al. Interaction of a 17q12 variant with both fetal and infant smoke exposure in the development of childhood asthma-like symptoms. *Allergy*. 2012 Jun; 67(6): 767–74.
4. Bisgaard H, Bønnelykke K, Sleiman PMA, Brasholt M, Chawes B, Kreiner-Møller E, et al. Chromosome 17q21 Gene Variants Are Associated with Asthma and Exacerbations but Not Atopy in Early Childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1; 179(3): 179–85.
5. Valiulis A, Bousquet J, Veryga A, Suprun U, Sergeenko D, Cebotari S, et al. Vilnius Declaration on chronic respiratory diseases: multisectoral care pathways embedding guided self-management, mHealth and air pollution in chronic respiratory diseases. *Clin Transl Allergy*. 2019 Dec; 9(1): 7.
6. Salehian S, Fleming L, Saglani S, Custovic A. Phenotype and endotype based treatment of preschool wheeze. *Expert Rev Respir Med*. 2023 Oct 3; 17(10): 853–64.
7. McCready C, Haider S, Little F, Nicol MP, Workman L, Gray DM, et al. Early childhood wheezing phenotypes and determinants in a South African birth cohort: longitudinal analysis of the Drakenstein Child Health Study. *Lancet Child Adolesc Health*. 2023 Feb; 7(2): 127–35.
8. Oksel C, Granell R, Haider S, Fontanella S, Simpson A, Turner S, et al. Distinguishing Wheezing Phenotypes from Infancy to Adolescence. A Pooled Analysis of Five Birth Cohorts. *Ann Am Thorac Soc*. 2019 Jul; 16(7): 868–76.
9. Al-Shamrani A, Bagais K, Alenazi A, Alqwaiee M, Al-Harbi AS. Wheezing in children: Approaches to diagnosis and management. *Int J Pediatr Adolesc Med*. 2019 Jun; 6(2): 68–73.
10. Doss AMA, Stokes JR. Viral Infections and Wheezing in Preschool Children. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2022 Nov; 42(4): 727–41.
11. Bloom CI, Franklin C, Bush A, Saglani S, Quint JK. Burden of preschool wheeze and progression to asthma in the UK: Population-

- based cohort 2007 to 2017. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 May; 147(5): 1949–58.
12. Just J, Belfar S, Wanin S, Pribil C, Grimfeld A, Duru G. Impact of Innate and Environmental Factors on Wheezing Persistence During Childhood. *J Asthma*. 2010 May; 47(4): 412–6.
 13. Sly PD, Boner AL, Björkstén B, Bush A, Custovic A, Eigenmann PA, et al. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. *The Lancet*. 2008 Sep; 372(9643): 1100–6.
 14. Shim JY. Association of wheezing phenotypes with fractional exhaled nitric oxide in children. *Korean J Pediatr*. 2014; 57(5): 211.
 15. Klaassen EMM, Van De Kant KDG, Jöbsis Q, Van Schayck OCP, Smolinska A, Dallinga JW, et al. Exhaled Biomarkers and Gene Expression at Preschool Age Improve Asthma Prediction at 6 Years of Age. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Jan 15; 191(2): 201–7.
 16. Van De Kant KDG, Jansen MA, Klaassen EMM, Van Der Grinten CP, Rijkers GT, Muris JWM, et al. Elevated inflammatory markers at preschool age precede persistent wheezing at school age. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 May; 23(3): 259–64.
 17. Cazzola M, Stolz D, Rogliani P, Matera MG. α_1 -Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders. *Eur Respir Rev*. 2020 Mar 31; 29(155): 190073.
 18. Chorostowska-Wynimko J. Targeted screening programmes in COPD: how to identify individuals with α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir Rev*. 2015 Mar; 24(135): 40–5.
 19. Bashir A, Shah NN, Hazari YM, Habib M, Bashir S, Hilal N, et al. Novel variants of SERPIN1A gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2016 Aug; 117: 139–49.
 20. Hiller AM, Piitulainen E, Tanash H. The Clinical Course of Severe Alpha-1-Antitrypsin Deficiency in Patients Identified by Screening. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2022 Jan; Volume 17: 43–52.
 21. Hovland V, Riiser A, Mowinckel P, Carlsen KH, Lødrup Carlsen KC. The significance of early recurrent wheeze for asthma outcomes in late childhood. *Eur Respir J*. 2013 Apr; 41(4): 838–45.
 22. Ma H, Li Y, Tang L, Peng X, Jiang L, Wan J, et al. Impact of childhood wheezing on lung function in adulthood: A meta-analysis. Leroyer C, editor. *PLOS ONE*. 2018 Feb 2; 13(2): e0192390.
 23. Sears MR. Predicting asthma outcomes. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Oct; 136(4): 829–36; quiz 837.

24. Wells AD, Woods A, Hilleman DE, Malesker MA. Alpha-1 Antitrypsin Replacement in Patients With COPD. *P T Peer-Rev J Formul Manag*. 2019 Jul; 44(7): 412–5.
25. Gramegna A, Aliberti S, Confalonieri M, Corsico A, Richeldi L, Vancheri C, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency as a common treatable mechanism in chronic respiratory disorders and for conditions different from pulmonary emphysema? A commentary on the new European Respiratory Society statement. *Multidiscip Respir Med*. 2018 Dec; 13(1): 39, s40248-018-0153–4.
26. Seifart C, Plagens A. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007; 2(4): 541–50.
27. Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J*. 2008 May 14; 32(4): 1096–110.
28. Valiulis A, Utkus A, Stukas R, Valiulis A, Siderius L, Leonardo da Vinci Alfa-1-Qual No. LLP-LdV-PRT-2011-LT-0300 project group. Introducing standards of the best medical practice for patients with inherited alpha-1-antitrypsin deficiency in Central Eastern Europe. *Pril Makedon Akad Na Nauk Umet Oddelenie Za Med Nauki*. 2014; 35(1): 107–14.
29. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Sep 10; 110(37): 15007–12.
30. Frenzel E, Wrenger S, Immenschuh S, Koszulla R, Welte T, Janciauskiene S. Acute phase protein α 1-Antitrypsin – a novel regulator of angiopoietin-like protein 4 transcription and secretion. *Pneumologie*. 2014 Jun 10; 68(06): s-0034-1376775.
31. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency: Table 1. *Thorax*. 2015 Jan; 70(1): 82–3.
32. Alam S, Li Z, Atkinson C, Jonigk D, Janciauskiene S, Mahadeva R. $Z \alpha_1$ -Antitrypsin Confers a Proinflammatory Phenotype That Contributes to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 15; 189(8): 909–31.
33. Chan ED, Pott GB, Silkoff PE, Ralston AH, Bryan CL, Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin inhibits nitric oxide production. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec 1; 92(6): 1251–60.

34. Nishioka T, Uchida K, Meno K, Ishii T, Aoki T, Imada Y, et al. Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *PROTEOMICS – Clin Appl*. 2008 Jan; 2(1): 46–54.
35. Brand PLP, Caudri D, Eber E, Gaillard EA, Garcia-Marcos L, Hedlin G, et al. Classification and pharmacological treatment of preschool wheezing: changes since 2008. *Eur Respir J*. 2014 Apr 1; 43(4): 1172–7.
36. Kappelle L, Brand PLP. Severe episodic viral wheeze in preschool children: High risk of asthma at age 5–10 years. *Eur J Pediatr*. 2012 Jun; 171(6): 947–54.
37. Bush A. Montelukast in paediatric asthma: where we are now and what still needs to be done? *Paediatr Respir Rev*. 2015 Mar; 16(2): 97–100.
38. Shin SY, Choi GS, Lee KH, Kim SW, Won KY, Lee JH, et al. Changes of Alpha1-Antitrypsin Levels in Allergen-induced Nasal Inflammation. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2011; 4(1): 33.
39. Kerkhof M, Boezen HM, Granell R, Wijga AH, Brunekreef B, Smit HA, et al. Transient early wheeze and lung function in early childhood associated with chronic obstructive pulmonary disease genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan; 133(1): 68–76.e4.
40. Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Dec; 13(1): 114.
41. Dasí F. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Med Clínica*. 2024 Apr; 162(7): 336–42.
42. Requena-Fernández MÁ, Dasí F, Castillo S, Barajas-Cenobi R, Navarro-García MM, Escribano A. Knowledge of Rare Respiratory Diseases among Paediatricians and Medical School Students. *J Clin Med*. 2020 Mar 22; 9(3): 869.
43. Feitosa PH. Diagnosis and augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: current knowledge and future potential. *Drugs Context*. 2023 Jul 20; 12: 1–9.
44. Franciosi AN, Alkhunaizi MA, Woodsmith A, Aldaihani L, Alkandari H, Lee SE, et al. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency and Tobacco Smoking: Exploring Risk Factors and Smoking Cessation in a Registry Population. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2021 Jan 2; 18(1): 76–82.
45. Strange C, Moseley MA, Jones Y, Schwarz L, Xie L, Brantly ML. Genetic Testing of Minors for Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006 May 1; 160(5): 531.

46. Hagen LEM, Schechter T, Luk Y, Brodovitch A, Gassas A, Doyle JJ. High alpha-1 antitrypsin clearance predicts severity of gut graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Transplant*. 2011 Sep; 15(6): 659–63.
47. Pott GB, Beard KS, Bryan CL, Merrick DT, Shapiro L. Alpha-1 Antitrypsin Reduces Severity of Pseudomonas Pneumonia in Mice and Inhibits Epithelial Barrier Disruption and Pseudomonas Invasion of Respiratory Epithelial Cells. *Front Public Health* [Internet]. 2013 [cited 2024 May 16];1. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2013.00019/abstract>
48. Weir GC, Ehlers MR, Harris KM, Kanaparthi S, Long A, Phippard D, et al. Alpha-1 antitrypsin treatment of new-onset type 1 diabetes: An open-label, phase I clinical trial (RETAIN) to assess safety and pharmacokinetics. *Pediatr Diabetes*. 2018 Aug; 19(5): 945–54.
49. Song S. Alpha-1 Antitrypsin Therapy for Autoimmune Disorders. *Chronic Obstr Pulm Dis J COPD Found*. 2018; 5(4): 289–301.
50. Zemtsovski JD, Tumpara S, Schmidt S, Vijayan V, Klos A, Laudeley R, et al. Alpha1-antitrypsin improves survival in murine abdominal sepsis model by decreasing inflammation and sequestration of free heme. *Front Immunol*. 2024 Mar 18; 15: 1368040.
51. Lolin YI, Ward AM. Alpha- 1-antitrypsin phenotypes and associated disease patterns in neurological patients. *Acta Neurol Scand*. 1995 May; 91(5): 394–8.
52. Collins CB, Aherne CM, Ehrentraut SF, Gerich ME, McNamee EN, McManus MC, et al. Alpha-1-antitrypsin Therapy Ameliorates Acute Colitis and Chronic Murine Ileitis: Inflamm Bowel Dis. 2013 Jul; 1.
53. Grimstein C, Choi YK, Wasserfall CH, Satoh M, Atkinson MA, Brantly ML, et al. Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model. *J Transl Med*. 2011 Dec; 9(1): 21.
54. Wilkinson DJ. Serpins in cartilage and osteoarthritis: what do we know? *Biochem Soc Trans*. 2021 Apr 30; 49(2): 1013–26.
55. Mauro AG, Mezzaroma E, Marchetti C, Narayan P, Del Buono MG, Capuano M, et al. A Preclinical Translational Study of the Cardioprotective Effects of Plasma-Derived Alpha-1 Anti-trypsin in Acute Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 May; 69(5): 273–8.
56. Zöller D, Haverkamp C, Makoudjou A, Sofack G, Kiefer S, Gebele D, et al. Alpha-1-antitrypsin-deficiency is associated with lower

- cardiovascular risk: an approach based on federated learning. *Respir Res.* 2024 Jan 18; 25(1): 38.
57. Elshikha AS, Lu Y, Chen MJ, Akbar M, Zeumer L, Ritter A, et al. Alpha 1 Antitrypsin Inhibits Dendritic Cell Activation and Attenuates Nephritis in a Mouse Model of Lupus. *PloS One.* 2016; 11(5): e0156583.
 58. Morris CA, Pani AM, Mervis CB, Rios CM, Kistler DJ, Gregg RG. Alpha 1 antitrypsin deficiency alleles are associated with joint dislocation and scoliosis in Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010 May 15; 154C(2): 299–306.
 59. Stockley RA. The multiple facets of alpha-1-antitrypsin. *Ann Transl Med.* 2015 Jun; 3(10): 130.
 60. Stakisaitis D, Basys V, Benetis R. Does alpha-1-proteinase inhibitor play a protective role in coronary atherosclerosis? *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2001; 7(4): 701–11.
 61. Beckman L, Sikström C, Mikelsaar AV, Krumina A, Kučinskas V, Beckman G. α_1 -Antitrypsin (PI) Alleles as Markers of Westeuropean Influence in the Baltic Sea Region. *Hum Hered.* 1999; 49(1): 52–5.
 62. Kuliešienė I, Firantienė R. Proteazių inhibitoriaus fenotipo nustatymo reikšmė, diagnozuojant įgimtą alfa 1-antitripsino trūkumą kūdikiams, turintiems hepatopatiją. *Pediatrija.* 2002; 2(2): 89–92.
 63. Serapinas D, Obrikyte V, Vaicius D, Balciuviene R, Valavicius A, Sakalauskas R. Alpha-1 antitrypsin deficiency and spontaneous pneumothorax: possible causal relationship. *Pneumol Buchar Rom.* 2014; 63(1): 32–5.
 64. Serapinas D, Sitkauskienė B, Sakalauskas R. Inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease patients with different α_1 antitrypsin genotypes. *Arch Med Sci.* 2012; 6: 1053–8.
 65. Tayebbeh Hamzehloei SG. Hereditary of alpha-1-Antitrypsin deficiency. Shiraz E-Med J [Internet]. 2013 Jan; 14(1). Available from: https://www.researchgate.net/publication/287242861_Hereditary_of_alpha-1-Antitrypsin_deficiency
 66. 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 Oct 1; 168(7): 818–900.
 67. Janciauskiene S, Lechowicz U, Pelc M, Olejnicka B, Chorostowska-Wynimko J. Diagnostic and therapeutic value of human serpin family proteins. *Biomed Pharmacother.* 2024 Jun; 175:116618.

68. Alessandro Sanduzzi, Emanuele Ciasullo, Ludovica Capitelli, Stefano Sanduzzi Zamparelli, Marialuisa Bocchino. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency and Bronchiectasis: A Concomitance or a Real Association? 2020 Mar 29; 17(7): 2294.
69. Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Dec; 13(1): 114.
70. Sabina Janciauskiene, Sabine Wrenger, Stephan Immenschuh, Beata Olejnicka, Timm Greulich, Tobias Welte, et al. The Multifaceted Effects of Alpha-1-Antitrypsin on Neutrophil Functions. 2018 Apr 17; 9: 341.
71. Janciauskiene S, Wrenger S, Immenschuh S, Olejnicka B, Greulich T, Welte T, et al. The Multifaceted Effects of Alpha-1-Antitrypsin on Neutrophil Functions. *Front Pharmacol*. 2018 Apr 17; 9: 341.
72. Seixas S, Marques PI. Known Mutations at the Cause of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency an Updated Overview of SERPINA1 Variation Spectrum. *Appl Clin Genet*. 2021 Mar; Volume 14: 173–94.
73. Janciauskiene S, Stevens T, Blanco I. New Insights into the Biology of 1-Antitrypsin and its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr Respir Med Rev*. 2007 May 1; 3(2): 147–58.
74. Donato LJ, Jenkins SM, Smith C, Katzmann JA, Snyder MR. Reference and Interpretive Ranges for α_1 -Antitrypsin Quantitation by Phenotype in Adult and Pediatric Populations. *Am J Clin Pathol*. 2012 Sep; 138(3): 398–405.
75. DeMeo DL. 1-Antitrypsin deficiency {middle dot} 2: Genetic aspects of 1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*. 2004 Mar 1; 59(3): 259–64.
76. Greulich T, Rodríguez-Frias F, Belmonte I, Klemmer A, Vogelmeier CF, Miravittles M. Real world evaluation of a novel lateral flow assay (AlphaKit® QuickScreen) for the detection of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir Res*. 2018 Dec; 19(1): 151.
77. Mesecha M, Attia M. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442030/>
78. Chambers JE, Zubkov N, Kubánková M, Nixon-Abell J, Mela I, Abreu S, et al. Z- α_1 -antitrypsin polymers impose molecular filtration in the endoplasmic reticulum after undergoing phase transition to a solid state. *Sci Adv*. 2022 Apr 8; 8(14): eabm2094.
79. Callea F, Giovannoni I, Francalanci P, Boldrini R, Faa G, Medicina D, et al. Mineralization of alpha-1-antitrypsin inclusion bodies in Mmalton

- alpha-1-antitrypsin deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Dec; 13(1): 79.
80. Figueira Gonçalves JM, Martínez Bugallo F, Díaz Pérez D, Martín Martínez MD, García-Talavera I, Pitti Pérez R. Clinical manifestations of the Mmalton alpha-1 antitrypsin deficiency variant. *Pulmonology*. 2018 Jan; 24(1): 48–9.
 81. Giacomuzzi E, Laffranchi M, Berardelli R, Ravasio V, Ferrarotti I, Gooptu B, et al. Real-world clinical applicability of pathogenicity predictors assessed on *SERPINA1* mutations in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hum Mutat*. 2018 Sep; 39(9): 1203–13.
 82. Laffranchi M, Berardelli R, Ronzoni R, Lomas DA, Fra A. Heteropolymerization of α -1-antitrypsin mutants in cell models mimicking heterozygosity. *Hum Mol Genet*. 2018 May 15; 27(10): 1785–93.
 83. Fra AM, Gooptu B, Ferrarotti I, Miranda E, Scabini R, Ronzoni R, et al. Three New Alpha1-Antitrypsin Deficiency Variants Help to Define a C-Terminal Region Regulating Conformational Change and Polymerization. Gasset M, editor. *PLoS ONE*. 2012 Jun 18; 7(6): e38405.
 84. Hua B, Fan L, Liang Y, Zhao Y, Tuddenham EGD. 1-antitrypsin Pittsburgh in a family with bleeding tendency. *Haematologica*. 2009 Jun 1; 94(6): 881–4.
 85. Sinden NJ, Koura F, Stockley RA. The significance of the F variant of alpha-1-antitrypsin and unique case report of a PiFF homozygote. *BMC Pulm Med*. 2014 Dec; 14(1): 132.
 86. Renoux C, Odou MF, Tosato G, Teoli J, Abbou N, Lombard C, et al. Description of 22 new alpha-1 antitrypsin genetic variants. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Dec; 13(1): 161.
 87. Hazari YM, Bashir A, Habib M, Bashir S, Habib H, Qasim MA, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutat Res Mutat Res*. 2017 Jul; 773: 14–25.
 88. Poller W, Merklein F, Schneider-Rasp S, Haack A, Fechner H, Wang H, et al. Molecular characterisation of the defective α 1-antitrypsin alleles PI Mwürzburg (Pro369Ser), Mheerlen (Pro369Leu), and Q0lisbon (Thr68Ile). *Eur J Hum Genet*. 1999 Apr; 7(3): 321–31.
 89. de Serres FJ, Blanco I. Prevalence of α 1-antitrypsin deficiency alleles PI*S and PI*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI*MS, PI*MZ, PI*SS, PI*SZ, and PI*ZZ: a comprehensive review. *Ther Adv Respir Dis*. 2012 Oct; 6(5): 277–95.

90. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta BBA – Mol Basis Dis.* 2001 Mar; 1535(3): 221–35.
91. Hamesch K, Mandorfer M, Pereira VM, Moeller LS, Pons M, Dolman GE, et al. Liver Fibrosis and Metabolic Alterations in Adults With alpha-1-antitrypsin Deficiency Caused by the Pi*ZZ Mutation. *Gastroenterology.* 2019 Sep; 157(3): 705–719.e18.
92. James K Stoller, Peter J Barnes, Paul Dieffenbach. Extrapulmonary manifestations of alpha-1 antitrypsin deficiency [Internet]. UpToDate; 2024. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/extrapulmonary-manifestations-of-alpha-1-antitrypsin-deficiency>
93. Balderacchi AM, Barzon V, Ottaviani S, Corino A, Zorzetto M, Wencker M, et al. Comparison of different algorithms in laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 2021 Jul 27; 59(8): 1384–91.
94. Belmonte I, Nuñez A, Barrecheguren M, Esquinas C, Pons M, López-Martínez RM, et al. Trends in Diagnosis of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Between 2015 and 2019 in a Reference Laboratory. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020 Oct; Volume 15: 2421–31.
95. Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Koblizek V, Lange P, Mahadeva R, et al. European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir J.* 2017 Nov; 50(5): 1700610.
96. Balduyck M, Chapuis Cellier C, Roche D, Odou MF, Joly P, Madelain V, et al. Development of a laboratory test on dried blood spots for facilitating early diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ann Biol Clin (Paris).* 2014 Nov; 72(6): 689–704.
97. Ruiz-Duque B, Bañuls L, Reinoso-Arija R, Carrasco-Hernandez L, Caballero-Eraso C, Dasí F, et al. Methodologies for the Determination of Blood Alpha1 Antitrypsin Levels: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2021 Oct 31; 10(21): 5132.
98. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, Ottaviani S, Zorzetto M, Gorrini M, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. *Transl Res.* 2007 Nov; 150(5): 267–74.
99. Morais IPA, Tóth IV, Rangel AOSS. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectrosc Lett.* 2006 Dec; 39(6): 547–79.

100. Laurell CB, Eriksson S. The Electrophoretic α_1 -Globulin Pattern of Serum in α_1 -Antitrypsin Deficiency. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013 Mar 7; 10(sup1): 3–8.
101. Rachelefsky G, Hogarth DK. Issues in the diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Apr; 121(4): 833–8.
102. Luisetti M. 1-Antitrypsin deficiency {middle dot} 1: Epidemiology of 1-antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2004 Feb 1; 59(2): 164–9.
103. Al-Jameil N, Hassan AA, Buhairan A, Hassanato R, Isac SR, Al-Otaiby M, et al. Genotyping diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency in Saudi adults with liver cirrhosis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Feb; 96(6): e6071.
104. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jordi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe 1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J*. 2010 May 1; 35(5): 960–8.
105. Blanco I. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of 1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J*. 2006 Jan 1; 27(1): 77–84.
106. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Dec; 3(1): 16.
107. Hernández-Pérez JM, Ramos-Díaz R, Vaquerizo-Pollino C, Pérez JA. Frequency of alleles and genotypes associated with alpha-1 antitrypsin deficiency in clinical and general populations: Revelations about underdiagnosis. *Pulmonology*. 2023 May; 29(3): 214–20.
108. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, et al. Alpha-1 antitrypsin Pi*Z gene frequency and Pi*ZZ genotype numbers worldwide: an update. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017 Feb; Volume 12: 561–9.
109. Blanco I, Diego I, Bueno P, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Miravittles M. Prevalence of α_1 -antitrypsin PiZZ genotypes in patients with COPD in Europe: a systematic review. *Eur Respir Rev*. 2020 Sep 30; 29(157): 200014.
110. Sveger T. Liver Disease in Alpha α_1 -Antitrypsin Deficiency Detected by Screening of 200,000 Infants. *N Engl J Med*. 1976 Jun 10; 294(24): 1316–21.
111. Çörtük M, DemiRkol B, Arslan MA, İlhan U, Kalkan YE, Turan D, et al. Frequency of alpha-1 antitrypsin deficiency and unexpected results in COPD patients in Turkey; rare variants are common. *Turk J Med Sci*. 2022 Jan 1; 52(5): 1478–85.

112. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Change in Lung Function and Morbidity from Chronic Obstructive Pulmonary Disease in α_1 -Antitrypsin MZ Heterozygotes: A Longitudinal Study of the General Population. *Ann Intern Med.* 2002 Feb 19; 136(4): 270.
113. Chu AS, Chopra KB, Perlmutter DH. Is severe progressive liver disease caused by alpha-1-antitrypsin deficiency more common in children or adults? *Liver Transpl.* 2016 Jul; 22(7): 886–94.
114. Perlmutter DH, Chopra K, Chu A. Two New Considerations for Improving the Diagnosis of α_1 -Antitrypsin Deficiency-Associated Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2015 Jun; 60(6): 1511–3.
115. Strange C. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Associated COPD. *Clin Chest Med.* 2020 Sep; 41(3): 339–45.
116. Piitulainen E, Tornling G, Eriksson S. Environmental correlates of impaired lung function in non-smokers with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax.* 1998 Nov 1; 53(11): 939–43.
117. Stoller JK, Aboussouan LS. A Review of α_1 -Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Feb 1; 185(3): 246–59.
118. Dey T, Kalita J, Weldon S, Taggart CC. Proteases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Med.* 2018 Aug 28; 7(9): 244.
119. Ortiz-Quintero B, Martínez-Espinosa I, Pérez-Padilla R. Mechanisms of Lung Damage and Development of COPD Due to Household Biomass-Smoke Exposure: Inflammation, Oxidative Stress, MicroRNAs, and Gene Polymorphisms. *Cells.* 2022 Dec 23; 12(1): 67.
120. Mitchell EL, Khan Z. Liver Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Approaches and Future Directions. *Curr Pathobiol Rep.* 2017 Sep; 5(3): 243–52.
121. Hinds R, Hadchouel A, Shanmugham NP, Al-Hussaini A, Chambers S, Cheeseman P, et al. Variable Degree of Liver Involvement in Siblings With PiZZ Alpha-1-Antitrypsin Deficiency-related Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul; 43(1): 136–8.
122. Zhu H, He J, Liu J, Zhang X, Yang F, Liu P, et al. Alpha 1-antitrypsin ameliorates ventilator-induced lung injury in rats by inhibiting inflammatory responses and apoptosis. *Exp Biol Med.* 2018 Jan; 243(1): 87–95.
123. Pott GB, Beard KS, Bryan CL, Merrick DT, Shapiro L. Alpha-1 Antitrypsin Reduces Severity of Pseudomonas Pneumonia in Mice and Inhibits Epithelial Barrier Disruption and Pseudomonas Invasion of Respiratory Epithelial Cells. *Front Public Health [Internet].* 2013 [cited 2024 Aug 22];1. Available

from:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2013.00019/abstract>

124. Peppers BP, Zacharias J, Michaud CR, Frith JA, Varma P, Henning M, et al. Association between $\alpha 1$ -antitrypsin and bronchiectasis in patients with humoral immunodeficiency receiving gammaglobulin infusions. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018 Feb; 120(2): 200–6.
125. Eden E, Choate R, Barker A, Addrizzo-Harris D, Aksamit TR, Daley CL, et al. The Clinical Features of Bronchiectasis Associated with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency, Common Variable Immunodeficiency and Primary Ciliary Dyskinesia--Results from the U.S. Bronchiectasis Research Registry. *Chronic Obstr Pulm Dis J COPD Found*. 2019; 6(2): 145–53.
126. Chan ED, Kaminska AM, Gill W, Chmura K, Feldman NE, Bai X, et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits Mycobacterium abscessus infection of macrophages. *Scand J Infect Dis*. 2007 Jan; 39(8): 690–6.
127. Lewis E. $\alpha 1$ -antitrypsin therapy for non-deficient individuals: integrating and mitigating cross-pathology inflammatory and immune responses to the injured cell. *Intern Med Rev [Internet]*. 2017 [cited 2024 Aug 23]; 3(5). Available from: <http://internalmedicinereview.org/index.php/imr/article/view/451>
128. Lewis EC. Expanding the Clinical Indications for $\alpha 1$ -Antitrypsin Therapy. *Mol Med*. 2012 Jun; 18(6): 957–70.
129. Marcondes AM, Hockenbery D, Lesnikova M, Dinarello CA, Woolfrey A, Gernsheimer T, et al. Response of Steroid-Refractory Acute GVHD to $\alpha 1$ -Antitrypsin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Sep; 22(9): 1596–601.
130. Magenau JM, Goldstein SC, Peltier D, Soiffer RJ, Braun T, Pawarode A, et al. $\alpha 1$ -Antitrypsin infusion for treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2018 Mar 22; 131(12): 1372–9.
131. Mauro AG, Mezzaroma E, Marchetti C, Narayan P, Del Buono MG, Capuano M, et al. A Preclinical Translational Study of the Cardioprotective Effects of Plasma-Derived Alpha-1 Anti-trypsin in Acute Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 May; 69(5): 273–8.
132. Toldo S, Mauro AG, Marchetti C, Rose SW, Mezzaroma E, Van Tassell BW, et al. Recombinant Human Alpha-1 Antitrypsin-Fc Fusion Protein Reduces Mouse Myocardial Inflammatory Injury After Ischemia–

- Reperfusion Independent of Elastase Inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016 Jul; 68(1): 27–32.
133. Toldo S, Seropian IM, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Salloum FN, Lewis EC, et al. Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia–reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Aug; 51(2): 244–51.
 134. Abbate A, Van Tassell BW, Christopher S, Abouzaki NA, Sonnino C, Oddi C, et al. Effects of Prolastin C (Plasma-Derived Alpha-1 Antitrypsin) on the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (from the VCU-Alpha 1-RT Pilot Study). *Am J Cardiol.* 2015 Jan; 115(1): 8–12.
 135. Madar T, Shahaf G, Sheiner E, Brazg J, Levinson J, Yaniv Salem S, et al. Low levels of circulating alpha-1 antitrypsin are associated with spontaneous abortions. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013 Dec; 26(18): 1782–7.
 136. Salem SY, Shahaf G, Sheiner E, Levinson J, Baron J, Madar T, et al. Diminished activity of circulating α 1-antitrypsin is associated with pre-gestational isolated obesity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Mar 24; 28(5): 500–3.
 137. Iskender I, Sakamoto J, Nakajima D, Lin H, Chen M, Kim H, et al. Human α 1-antitrypsin improves early post-transplant lung function: Pre-clinical studies in a pig lung transplant model. *J Heart Lung Transplant.* 2016 Jul; 35(7): 913–21.
 138. Grimstein C, Choi YK, Wasserfall CH, Satoh M, Atkinson MA, Brantly ML, et al. Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model. *J Transl Med.* 2011 Dec; 9(1): 21.
 139. Elshikha AS, Lu Y, Chen MJ, Akbar M, Zeumer L, Ritter A, et al. Alpha 1 Antitrypsin Inhibits Dendritic Cell Activation and Attenuates Nephritis in a Mouse Model of Lupus. Crispin J, editor. *PLOS ONE.* 2016 May 27; 11(5): e0156583.
 140. Subramanian S, Shahaf G, Ozeri E, Miller LM, Vandenbark AA, Lewis EC, et al. Sustained expression of circulating human alpha-1 antitrypsin reduces inflammation, increases CD4+FoxP3+ Treg cell population and prevents signs of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Metab Brain Dis.* 2011 Jun; 26(2): 107–13.
 141. Fleixo-Lima G, Ventura H, Medini M, Bar L, Strauss P, Lewis EC. Mechanistic Evidence in Support of Alpha1-Antitrypsin as a Therapeutic Approach for Type 1 Diabetes. *J Diabetes Sci Technol.* 2014 Nov; 8(6): 1193–203.

142. Collins CB, Aherne CM, Ehrentraut SF, Gerich ME, McNamee EN, McManus MC, et al. Alpha-1-antitrypsin Therapy Ameliorates Acute Colitis and Chronic Murine Ileitis: Inflamm Bowel Dis. 2013 Jul; 1.
143. Stone H, Pye A, Stockley RA. Disease associations in alpha-1-antitrypsin deficiency. Respir Med. 2014 Feb; 108(2): 338–43.
144. Rachmiel M, Strauss P, Dror N, Benzaquen H, Horesh O, Tov N, et al. Alpha-1 antitrypsin therapy is safe and well tolerated in children and adolescents with recent onset type 1 diabetes mellitus: Alpha-1 antitrypsin is safe in diabetic youth. Pediatr Diabetes. 2016 Aug; 17(5): 351–9.
145. Gottlieb PA, Alkanani AK, Michels AW, Lewis EC, Shapiro L, Dinarello CA, et al. α 1-Antitrypsin Therapy Downregulates Toll-Like Receptor-Induced IL-1 β Responses in Monocytes and Myeloid Dendritic Cells and May Improve Islet Function in Recently Diagnosed Patients With Type 1 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Aug 1; 99(8): E1418–26.
146. Maicas N, Van Der Vlag J, Bublitz J, Florquin S, Bakker-van Bebbber M, Dinarello CA, et al. Human Alpha-1-Antitrypsin (hAAT) therapy reduces renal dysfunction and acute tubular necrosis in a murine model of bilateral kidney ischemia-reperfusion injury. Dussaule JC, editor. PLOS ONE. 2017 Feb 24; 12(2): e0168981.
147. Feng Y, Hu L, Xu Q, Yuan H, Ba L, He Y, et al. Cytoprotective Role of Alpha-1 Antitrypsin in Vascular Endothelial Cell Under Hypoxia/Reoxygenation Condition: J Cardiovasc Pharmacol. 2015 Jul; 66(1): 96–107.
148. Guttman O, Baranovski BM, Schuster R, Kaner Z, Freixo-Lima GS, Bahar N, et al. Acute-phase protein α 1-anti-trypsin: diverting injurious innate and adaptive immune responses from non-authentic threats. Clin Exp Immunol. 2015 Jan 2; 179(2): 161–72.
149. Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, Gomez-Mariano G, Wrenger S, Korenbaum E, et al. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. Cancers. 2019 Sep 4; 11(9): 1306.
150. Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The Natural History of Chronic Airflow Obstruction Revisited: An Analysis of the Framingham Offspring Cohort. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Jul 1; 180(1): 3–10.
151. Molloy K, Hersch CP, Morris VB, Carroll TP, O'Connor CA, Lasky-Su JA, et al. Clarification of the Risk of Chronic Obstructive Pulmonary

- Disease in α_1 -Antitrypsin Deficiency PiMZ Heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Feb 15; 189(4): 419–27.
152. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD. Susceptibility Genes for Rapid Decline of Lung Function in the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb 1; 163(2): 469–73.
 153. DeMeo DL, Campbell EJ, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. *IL10* Polymorphisms Are Associated with Airflow Obstruction in Severe α_1 -Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jan; 38(1): 114–20.
 154. Hersh CP. Chronic obstructive pulmonary disease in α_1 -antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax*. 2004 Oct 1; 59(10): 843–9.
 155. Franciosi AN, Hobbs BD, McElvaney OJ, Molloy K, Hersh C, Clarke L, et al. Clarifying the Risk of Lung Disease in SZ Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jul 1; 202(1): 73–82.
 156. Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Kobliczek V, Lange P, Mahadeva R, et al. European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2017 Nov; 50(5): 1700610.
 157. Oelsner EC, Balte PP, Bhatt SP, Cassano PA, Couper D, Folsom AR, et al. Lung function decline in former smokers and low-intensity current smokers: a secondary data analysis of the NHLBI Pooled Cohorts Study. *Lancet Respir Med*. 2020 Jan; 8(1): 34–44.
 158. Rossi A, Butorac Petanjek B, Chilosi M, G Cosio B, Flezar M, Koulouris N, et al. Chronic obstructive pulmonary disease with mild airflow limitation: current knowledge and proposal for future research – a consensus document from six scientific societies. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017 Aug; Volume 12: 2593–610.
 159. Agustí A, Celli BR, Criner GJ, Halpin D, Anzueto A, Barnes P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary. *Arch Bronconeumol*. 2023 Apr; 59(4): 232–48.
 160. Hoesterey D, Das N, Janssens W, Buhr RG, Martinez FJ, Cooper CB, et al. Spirometric indices of early airflow impairment in individuals at risk of developing COPD: Spirometry beyond FEV1/FVC. *Respir Med*. 2019 Sep; 156: 58–68.
 161. Tagiyeva N, Devereux G, Fielding S, Turner S, Douglas G. Outcomes of Childhood Asthma and Wheezy Bronchitis. A 50-Year Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jan 1; 193(1): 23–30.

162. Svanes C, Sunyer J, Plana E, Dharmage S, Heinrich J, Jarvis D, et al. Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2010 Jan 1; 65(1): 14–20.
163. Kerkhof M, Boezen HM, Granell R, Wijga AH, Brunekreef B, Smit HA, et al. Transient early wheeze and lung function in early childhood associated with chronic obstructive pulmonary disease genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan; 133(1): 68–76.e4.
164. Vishweswaraiah S, Ramachandra N, Joshi N, Parthasarathi A, Kaleem Ullah M, Siddaiah J, et al. Association between ADAM33 Single-Nucleotide Polymorphisms and Treatment Response to Inhaled Corticosteroids and a Long-Acting Beta-Agonist in Asthma. *Diagnostics*. 2023 Jan 22; 13(3): 405.
165. Siri D, Farah H, Hogarth DK. Distinguishing alpha1-antitrypsin deficiency from asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Dec; 111(6): 458–64.
166. Ye Q, D’Urzo AD. Challenge of α 1-antitrypsin deficiency diagnosis in primary care. *Can Fam Physician Med Fam Can*. 2016 Nov; 62(11): 899–901.
167. Hussain M, Liu G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells*. 2024 Feb 23; 13(5): 384.
168. Chung HL. Diagnosis and management of asthma in infants and preschoolers. *Clin Exp Pediatr*. 2022 Dec 15; 65(12): 574–84.
169. Thomsen SF. Exploring the origins of asthma: Lessons from twin studies. *Eur Clin Respir J*. 2014 Jan; 1(1): 25535.
170. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *N Engl J Med*. 1995 Jan 19; 332(3): 133–8.
171. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, et al. Outcome of Asthma and Wheezing in the First 6 Years of Life: Follow-up through Adolescence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Nov 15; 172(10): 1253–8.
172. Grad R, Morgan WJ. Long-term outcomes of early-onset wheeze and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Aug; 130(2): 299–307.
173. Samet JM, Tager IB, Speizer FE. The Relationship Between Respiratory Illness in Childhood and Chronic Air-Flow Obstruction in Adulthood ^{1–3}. *Am Rev Respir Dis*. 1983 Apr; 127(4): 508–23.
174. Martinez FD. Early-Life Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Drazen JM, editor. *N Engl J Med*. 2016 Sep; 375(9): 871–8.

175. McGeachie MJ. Childhood asthma is a risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017 Apr; 17(2): 104–9.
176. Piitulainen E. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax*. 2002 Aug 1; 57(8): 705–8.
177. Wadsworth MEJ, Vinall LE, Jones AL, Hardy RJ, Whitehouse DB, Butterworth SL, et al. Alpha₁-Antitrypsin as a Risk for Infant and Adult Respiratory Outcomes in a National Birth Cohort. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Nov; 31(5): 559–64.
178. Stirpe E, Bardaro F. Alpha1-antitrypsin deficiency and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis [Internet]*. 2022 Feb 22 [cited 2024 Sep 19]; Available from: <https://www.monaldi-archives.org/index.php/macd/article/view/2179>
179. Aiello M, Frizzelli A, Pisi R, Fantin A, Ghirardini M, Marchi L, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency is significantly associated with atopy in asthmatic patients. *J Asthma*. 2022 Jan 2; 59(1): 23–30.
180. Jackson DJ. Early-life viral infections and the development of asthma: a target for asthma prevention? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr; 14(2): 131–6.
181. Çalışkan M, Bochkov YA, Kreiner-Møller E, Bønnelykke K, Stein MM, Du G, et al. Rhinovirus Wheezing Illness and Genetic Risk of Childhood-Onset Asthma. *N Engl J Med*. 2013 Apr 11; 368(15): 1398–407.
182. Inoue Y, Shimojo N. Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children. *Front Microbiol [Internet]*. 2013 [cited 2024 Jul 7]; 4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00391/abstract>
183. Maule M, Olivieri B, Guarnieri G, De Franceschi L, Martinelli N, Vaia R, et al. Hidden Comorbidities in Asthma: A Perspective for a Personalized Approach. *J Clin Med*. 2023 Mar 15; 12(6): 2294.
184. Martín-González E, Hernández-Pérez JM, Pérez JAP, Pérez-García J, Herrera-Luis E, González-Pérez R, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency and Pi*S and Pi*Z SERPINA1 variants are associated with asthma exacerbations. *Pulmonology*. 2023 May; S2531043723000910.
185. Hernández-Pérez JM, Martín-González E, González-Carracedo MA. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency and SERPINA1 Variants Could Play a Role in Asthma Exacerbations. *Arch Bronconeumol*. 2023 Jul; 59(7): 416–7.

186. Pini L, Paoletti G, Heffler E, Tantucci C, Puggioni F. Alpha1-antitrypsin deficiency and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2021 Feb; 21(1): 46–51.
187. Suárez-Lorenzo I, De Castro FR, Cruz-Niesvaara D, Herrera-Ramos E, Rodríguez-Gallego C, Carrillo-Díaz T. Alpha 1 antitrypsin distribution in an allergic asthmatic population sensitized to house dust mites. *Clin Transl Allergy*. 2018 Dec; 8(1): 44.
188. Stirpe E, Bardaro F. Alpha1-antitrypsin deficiency and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* [Internet]. 2022 Feb 22 [cited 2024 Sep 4]; Available from: <https://www.monaldi-archives.org/index.php/macd/article/view/2179>
189. Feitosa PH. Diagnosis and augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: current knowledge and future potential. *Drugs Context*. 2023 Jul 20; 12: 1–9.
190. Teckman J. α_1 -Antitrypsin Deficiency in Childhood. *Semin Liver Dis*. 2007 Aug; 27(3): 274–81.
191. Teckman JH. Liver Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Understanding and Future Therapy. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013 Mar 7; 10(sup1): 35–43.
192. Mahadeva R, Chang WSW, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, et al. Heteropolymerization of S, I, and Z α_1 -antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest*. 1999 Apr 1; 103(7): 999–1006.
193. Teckman JH, Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb; 9(2): 261–8.
194. Suri A, Patel D, Teckman JH. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2022 Aug; 26(3): 391–402.
195. Feldman A, Sokol RJ. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency: An Important Cause of Pediatric Liver Disease. *Lung Health Prof Mag*. 2013; 4(2): 8–11.
196. Bakula A, Pawlowska J, Niewiadomska O, Jankowska I, Teisseyre M, Kaliciński P, et al. Liver Transplantation in Polish Children With α_1 -Antitrypsin Deficiency: A Single-Center Experience. *Transplant Proc*. 2016 Dec; 48(10): 3323–7.
197. Clark VC. Liver Transplantation in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Clin Liver Dis*. 2017 May; 21(2): 355–65.
198. Alpha-1-antitrypsin (α_1 AT) Deficiency. [Internet]. Available from: <http://childrennetwork.org>
199. Sveger T, Eriksson S. The liver in adolescents with α -antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 1995 Aug; 22(2): 514–7.

200. Patel D, McAllister SL, Teckman JH. Alpha-1 antitrypsin deficiency liver disease. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021 Apr; 6: 23–23.
201. Teckman J, Rosenthal P, Ignacio RV, Spino C, Bass LM, Horslen S, et al. Neonatal cholestasis in children with Alpha-1-AT deficiency is a risk for earlier severe liver disease with male predominance. *Hepatol Commun* [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Sep 20]; 7(12). Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/HC9.0000000000000345>
202. Cruz PE, Mueller C, Cossette TL, Golant A, Tang Q, Beattie SG, et al. In vivo post-transcriptional gene silencing of α -1 antitrypsin by adeno-associated virus vectors expressing siRNA. *Lab Invest*. 2007 Sep; 87(9): 893–902.
203. Ruiz M, Joly P, Lachaux A. Severe Liver Disease in Children With α -1 Antitrypsin Deficiency in France (DEFI-ALPHA Cohort). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2015 Nov [cited 2024 Sep 20]; 61(5). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1097/MPG.0000000000000932>
204. Teckman JH, Rosenthal P, Abel R, Bass LM, Michail S, Murray KF, et al. Baseline Analysis of a Young α -1-Antitrypsin Deficiency Liver Disease Cohort Reveals Frequent Portal Hypertension. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015 Jul; 61(1): 94–101.
205. Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. *Clin Liver Dis*. 2004 Nov; 8(4): 839–59.
206. Sveger T. The Natural History of Liver Disease in (α ₁ -Antitrypsin Deficient Children. *Acta Paediatr*. 1988 Nov; 77(6): 847–51.
207. Mowat AP. Alpha ₁ -antitrypsin deficiency (PiZZ): features of liver involvement in childhood. *Acta Paediatr*. 1994 Feb; 83(s393): 13–7.
208. Eriksson S. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Hepatol*. 1999; 30 Suppl 1: 34–9.
209. Tanash HA, Piitulainen E. Liver disease in adults with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *J Gastroenterol*. 2019 Jun; 54(6): 541–8.
210. Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA. Alpha ₁ -Antitrypsin Deficiency. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2020 Apr 9; 382(15): 1443–55.
211. Potočnjak I, Tešović G, Tešija Kuna A, Štefanović M, Žaja O. Unusually difficult clinical presentation of an infant suffering from congenital cytomegalovirus (CMV) infection combined with alpha 1-antitrypsin (A1AT) deficiency. *Biochem Medica*. 2014; 24(3): 396–402.
212. Topic A, Ljujic M, Radojkovic D. Alpha 1 Antitrypsin in Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2024 Sep 22]; 12(10 HCC). Available from: <https://brieflands.com/articles/hepatmon-70438.html>

213. Patel D, Teckman J. Liver disease with unknown etiology – have you ruled out alpha-1 antitrypsin deficiency? *Ther Adv Chronic Dis*. 2021 Jan; 12_suppl: 204062232199568.
214. Chu AS, Chopra KB, Perlmutter DH. Is severe progressive liver disease caused by alpha-1-antitrypsin deficiency more common in children or adults? *Liver Transpl*. 2016 Jul; 22(7): 886–94.
215. Rudnick DA, Liao Y, An JK, Muglia LJ, Perlmutter DH, Teckman JH. Analyses of hepatocellular proliferation in a mouse model of α -1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2004 Mar 25; 39(4): 1048–55.
216. McElvaney GN, Sandhaus RA, Miravittles M, Turino GM, Seersholm N, Wencker M, et al. Clinical considerations in individuals with α ₁-antitrypsin PI*SZ genotype. *Eur Respir J*. 2020 Jun; 55(6): 1902410.
217. Comba A, Demirbaş F, Çaltepe G, Eren E, Kalayci AG. Retrospective analysis of children with α -1 antitrypsin deficiency. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul; 30(7): 774–8.
218. Ruiz M, Lacaille F, Berthiller J, Joly P, Dumortier J, Aumar M, et al. Liver disease related to alpha1-antitrypsin deficiency in French children: The DEFI-ALPHA cohort. Tacke F, editor. *Liver Int*. 2019 Jun; 39(6): 1136–46.
219. Joly P, Guillaud O, Hervieu V, Francina A, Mornex JF, Chapuis-Cellier C. Clinical heterogeneity and potential high pathogenicity of the Mmalton Alpha 1 antitrypsin allele at the homozygous, compound heterozygous and heterozygous states. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 Dec; 10(1): 130.
220. Chappell S, Hadzic N, Stockley R, Guetta-Baranes T, Morgan K, Kalsheker N. A polymorphism of the alpha1-antitrypsin gene represents a risk factor for liver disease. *Hepatology*. 2007 Oct 30; 47(1): 127–32.
221. Pan S, Huang L, McPherson J, Muzny D, Rouhani F, Brantly M, et al. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2009 Jul; 50(1): 275–81.
222. Qu D, Teckman JH, Omura S, Perlmutter DH. Degradation of a Mutant Secretory Protein, α 1-Antitrypsin Z, in the Endoplasmic Reticulum Requires Proteasome Activity. *J Biol Chem*. 1996 Sep; 271(37): 22791–5.
223. Piitulainen E, Carlson J, Ohlsson K, Sveger T. α 1-Antitrypsin Deficiency in 26-Year-Old Subjects. *Chest*. 2005 Oct; 128(4): 2076–81.
224. Tretter JT. Adding α -1 Antitrypsin Deficiency to the Newborn Screen. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2015 Apr [cited 2024 Sep 22]; 60(4).

- Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1097/MPG.0000000000000720>
225. Teckman J, Pardee E, Howell RR, Mannino D, Sharp RR, Brantly M, et al. Appropriateness of Newborn Screening for α 1-Antitrypsin Deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Feb; 58(2): 199–203.
 226. Khan Z. Pathogenesis of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in the Liver: New Approaches to Old Questions. *J Liver Res Disord Ther* [Internet]. 2016 May 17 [cited 2024 Sep 22]; 2(2). Available from: <https://medcraveonline.com/JLRDT/pathogenesis-of-alpha-1-antitrypsin-deficiency-in-the-liver-new-approaches-to-old-questions.html>
 227. Yuan C, Chang D, Lu G, Deng X. Genetic polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017 May; Volume 12: 1385–93.
 228. Chorostowska-Wynimko J, Nizankowska-Mogilnicka E, Grupa robocza Polskiego Towarzystwa Chórob Płuc, Bakuła A, Górecka D, Kulus M, et al. [Diagnosis and treatment of patients with alpha-1 antitrypsin (alpha-1 AT) deficiency]. *Pneumonol Alergol Pol.* 2010; 78(5): 348–55.
 229. Struniawski R, Szpechcinski A, Poplawska B, Skronski M, Chorostowska-Wynimko J. Rapid DNA Extraction Protocol for Detection of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency from Dried Blood Spots by Real-Time PCR. In: Pokorski M, editor. *Respiratory Regulation – The Molecular Approach* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013 [cited 2024 Sep 10]. p. 29–37. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 756). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-4549-0_5
 230. Berry CE, Billheimer D, Jenkins IC, Lu ZJ, Stern DA, Gerald LB, et al. A Distinct Low Lung Function Trajectory from Childhood to the Fourth Decade of Life. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Sep 1; 194(5): 607–12.
 231. Teijeiro A, Badellino H, Raiden MG, Cuello MN, Kevorkof G, Gatti C, et al. Risk factors for recurrent wheezing in the first year of life in the city of Córdoba, Argentina. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017 May; 45(3): 234–9.
 232. Chandrasekhar V, Banu A, Kumar S, Syed M. Prevalence and risk factors associated with wheezing in young children less than 5 years of age: a retrospective study. [Internet]. *sjhr*; 2023 [cited 2024 Jul 16]. Available from: <https://sjhresearchafrica.org/index.php/public-html/article/view/488>

233. Zhu Y, Chen L, Miao Y, Chen J, Bai M, Gao H, et al. An analysis of risk factors associated with recurrent wheezing in the pediatric population. *Ital J Pediatr*. 2023 Mar 16; 49(1): 31.
234. Martín-González E, Hernández-Pérez JM, Pérez JAP, Pérez-García J, Herrera-Luis E, González-Pérez R, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency and Pi*S and Pi*Z SERPINA1 variants are associated with asthma exacerbations. *Pulmonology*. 2023 May; S2531043723000910.
235. I. C. J. Faria, A. D. C. Toro, J. D. Ribeiro, C. S. Bertuzzo. Alpha 1 antitrypsin (A1AT) deficiency in children with asthma in Brazil. *Eur Respir J* 2003; 22: Suppl. 45, 3128. *Eur Respir J* 2003 22 Suppl 45 3128. 2003; 22: 45.
236. Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA. Mechanisms of emphysema in 1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *Eur Respir J*. 2009 Aug 1; 34(2): 475–88.
237. Chorostowska-Wynimko J. The incidence of severe alpha-1-antitrypsin (AAT) deficiency alleles in COPD patients — Preliminary results from Central Eastern European (CEE) AAT NETWORK. *Eur Respir Soc* [Internet]. 2013; (vol. 42 no. Suppl 57). Available from: https://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl_57/P541.article-info
238. Serapinas D. Alfa-1 antitripsino poveikis monocitų aktyvumui in vitro bei genotipo įtaka lėtinės obstrukcinės plaučių ligos ypatumams [Internet]. 2009. Available from: <https://ismu.lt/cris/entities/publication/d6be1d77-a7b4-4950-8536-4e60723e2ab6/details>
239. Bernspång E, Wollmer P, Sveger T, Piitulainen E. Lung function in 30-year-old alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. *Respir Med*. 2009 Jun; 103(6): 861–5.
240. Piitulainen E, Mostafavi B, Tanash H. Health status and lung function in the Swedish alpha 1-antitrypsin deficient cohort, identified by neonatal screening, at the age of 37-40 years. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017 Feb; Volume 12: 495–500.
241. Schramm GR, Mostafavi B, Piitulainen E, Wollmer P, Tanash HA. Lung Function and Health Status in Individuals with Severe Alpha-1-Antitrypsin Deficiency at the Age of 42. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021 Dec; Volume 16: 3477–85.
242. Colp C, Pappas J, Moran D, Lieberman J. Variants of α 1-Antitrypsin in Puerto Rican Children With Asthma. *Chest*. 1993 Mar; 103(3): 812–5.
243. Chappell S, Daly L, Morgan K, Guetta Baranes T, Roca J, Rabinovich R, et al. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to

- chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mutat.* 2006 Jan; 27(1): 103–9.
244. Fujimoto K, Ikeda S, Arai T, Tanaka N, Kumasaka T, Ishii T, et al. Polymorphism of SERPINE2 gene is associated with pulmonary emphysema in consecutive autopsy cases. *BMC Med Genet* [Internet]. 2010 Dec [cited 2024 Sep 17]; 11(1). Available from: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-11-159>
 245. Von Ehrenstein OS. 1 Antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. *Arch Dis Child.* 2004 Mar 1; 89(3): 230–1.
 246. Stockley RA. Alpha1-antitrypsin Review. *Clin Chest Med.* 2014 Mar; 35(1): 39–50.
 247. Silverman EK. Risk of Lung Disease in PI MZ Heterozygotes. Current Status and Future Research Directions. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 Aug; 13(Supplement_4): S341–5.
 248. Al Ashry HS, Strange C. COPD in individuals with the PiMZ alpha-1 antitrypsin genotype. *Eur Respir Rev.* 2017 Dec 31; 26(146): 170068.
 249. Janciauskiene S, Welte T. Well-Known and Less Well-Known Functions of Alpha-1 Antitrypsin. Its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Other Disease Developments. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 Aug; 13(Supplement_4): S280–8.
 250. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Sep 10; 110(37): 15007–12.
 251. Houston DS, Carson CW, Esmon CT. Endothelial Cells and Extracellular Calmodulin Inhibit Monocyte Tumor Necrosis Factor Release and Augment Neutrophil Elastase Release. *J Biol Chem.* 1997 May; 272(18): 11778–85.
 252. Fraser A, Macdonald-Wallis C, Tilling K, Boyd A, Golding J, Davey Smith G, et al. Cohort Profile: The Avon Longitudinal Study of Parents and Children: ALSPAC mothers cohort. *Int J Epidemiol.* 2013 Feb 1; 42(1): 97–110.
 253. Siedlinski M, Klanderman B, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, et al. Association of cigarette smoking and CRP levels with DNA methylation in α -1 antitrypsin deficiency. *Epigenetics.* 2012 Jul; 7(7): 720–8.
 254. Corbo GM. Passive smoking and lung function in alpha1-antitrypsin heterozygote schoolchildren. *Thorax.* 2003 Mar 1; 58(3): 237–41.

255. Granell R, Henderson AJ, Sterne JA. Associations of wheezing phenotypes with late asthma outcomes in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children: A population-based birth cohort. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct; 138(4): 1060–1070.e11.
256. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genet Epidemiol*. 2010 Dec 1; 34(8): 816–34.

PRIEDAI

1 PRIEDAS. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas VšĮ Vilniaus miesto klinikinei ligoninei.

PATVIRTINTA
Lietuvos bioetikos komiteto direktoriaus
2016 m. birželio 10 d. įsakymu Nr. V-14



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Bindžetinė įstaiga, Vilniaus g. 16, LT-01402 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,
faks. (8 5) 260 8640, el. p. lbek@bioetika.sam.lt, <http://bioetika.sam.lt>
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-09-28 Nr.: L-16-07/1

Vilnius

Tyrimo pavadinimas: „Alfa-1-antitripsino variantų ir koncentracijos ryšys su ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu“	
Protokolo Nr.: AATWEC Versija: 1.0b Data: 2016 m. vasario 01 d.	
Tiriamiesiems skirti dokumentai: Informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba): Versija: 1.0 Data: 2016 m. liepos 04 d.	
Pagrindinis tyrėjas: Gyd., habil. dr., prof. Arūnas Valiulis	
Tyrimo centro pavadinimas: VšĮ Vilniaus miesto klinikinė ligoninė Adresas: Antakalnio g. 57, LT-10207, Vilnius, Lietuva	

Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą išduotas Lietuvos bioetikos komiteto Biomedicininį tyrimų ekspertų grupės posėdžio, įvykusio **2016 m. rugsėjo 27 d.**, sprendimu.

Direktorius

Eugenijus Gefenas



2 PRIEDAS. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas VšĮ Vilniaus universitetinei ligoninei Santaros klinikos.

PATVIRTINTA
Lietuvos bioetikos komiteto direktoriaus
2016 m. birželio 10 d. įsakymu Nr. V-14



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Biudžetinė įstaiga, Vilniaus g. 16, LT-01402 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,
faks. (8 5) 260 8640, el. p. lbe@bioetika.sam.lt, <http://bioetika.sam.lt>
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-09-28 Nr.: L-16-07/2

Vilnius

Tyrimo pavadinimas: „Alfa-1-antitripsino variantų ir koncentracijos ryšys su ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu“	
Protokolo Nr.: AATWEC Versija: 1.0b Data: 2016 m. vasario 01 d.	
Tiriamiesiems skirti dokumentai: Informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba): Versija: 1.0 Data: 2016 m. liepos 04 d.	
Pagrindinis tyrėjas: Gyd., med. m. dr., prof. Sigita Petraitienė	
Tyrimo centro pavadinimas: Vaikų ligoninė, viešosios įstaigos Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialas Adresas: Santariškių g. 7, LT-08406 Vilnius, Lietuva	

Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą išduotas Lietuvos bioetikos komiteto Biomedicininį tyrimų ekspertų grupės posėdžio, įvykusio 2016 m. rugsėjo 27 d., sprendimu.

Direktorius

Eugenijus Gefenas



3 PRIEDAS. Lietuvos bioetikos komiteto leidimas VšĮ Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikoms.

PATVIRTINTA
Lietuvos bioetikos komiteto direktoriaus
2016 m. birželio 10 d. įsakymu Nr. V-14



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Biudžetinė įstaiga, Vilniaus g. 16, LT-01402 Vilnius, tel. (8 5) 212 4565,
faks. (8 5) 260 8640, el. p. lbek@bioetika.sam.lt, <http://bioetika.sam.lt>
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 188710595

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2016-09-28 Nr.: L-16-07/3

Vilnius

Tyrimo pavadinimas: „Alfa-1-antitripsino variantų ir koncentracijos ryšys su ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu“	
Protokolo Nr.: AATWEC Versija: 1.0b Data: 2016 m. vasario 01 d.	
Tiriamiesiems skirti dokumentai: Informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba): Versija: 1.0 Data: 2016 m. liepos 04 d.	
Pagrindinis tyrėjas: Gyd., med. m. dr. Valdonė Misevičienė	
Tyrimo centro pavadinimas: VšĮ Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikos Adresas: Eivenių 2, LT-50009 Kaunas, Lietuva	

Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą išduotas Lietuvos bioetikos komiteto Biomedicininį tyrimų ekspertų grupės posėdžio, įvykusio **2016 m. rugsėjo 27 d.**, sprendimu.

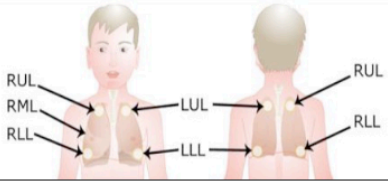
Direktorius

Eugenijus Gefenas



4 PRIEDAS. Vaikų kvėpavimo būklės vertinimo skalė (*Pediatric Respiratory Assessment Measure – PRAM*).

PEDIATRINĖ KVĖPAVIMO ĮVERTINIMO SKALĖ

Kriterijus	Reikšmių apibūdinimas	Įvertis (balai)	Pastabos
O ₂ saturacija	>= 95% 92-94% <92%	0 1 2	O ₂ saturacija turi būti matuojama vaikui kvėpuojant aplinkos oru kol stabilizuosis oksimetrijos reikšmė (bent 1 minutę). Matuodami išjunkite O ₂ tiekimo prietaisą. Jei saturacija <92%, nedelsdami tęskite O ₂ tiekimą ir skirkite maksimalų įvertį (2).
Virškrūtinkauliniai įtraukimai	Nėra Yra	0 2	Virškrūtinkauliniai įtraukimai – tai odos įtraukimas virš krūtinkaulio ir tarp galvos sukamųjų raumenų kiekvieno įkvėpimo metu <u>Įvertinama vizualiai!</u>
Kaklo laiptinių raumenų susitraukimai	Nėra Yra	0 2	Laiptiniai raumenys priklauso giliųjų kaklo raumenų grupei, lokalizuoti šoninėje apatinėje kaklo dalyje. <u>Įvertinama palpuojant!</u> Apčiuopos sritį nurodo raktikaulis (iš priekio), trapecinis raumuo (iš nugaros). Šis požymis būdingas tik sunkių paūmėjimų atvejais.
Oro patekimas	• Normalus • Sumažėjęs apatinėse srityse • Sumažėjęs viršūnėje ir bazalinėse srityse • Minimalus ar neišsklausomas	0 1 2 3	Oro patekimą vertinkite auskultuojant plaučių laukus. Plaučių laukas – tai dvi vertikalios gretimos plaučių skilčių auskultacijos zonos: Vertinama pagal sunkiausiai pakenktą plaučių lauką. Priekinis dešinysis plaučių laukas: RUL ir RML Nugarinis dešinysis plaučių laukas: RUL ir RLL Priekinis kairysis plaučių laukas: LUL ir LLL Nugarinis kairysis plaučių laukas: LUL ir LLL 
Švokštimas	• Nėra • Tik iškvėpimo metu • Įkvėpimo (+/- iškvėpimo) • Girdimas be stetoskopo arba nebylūs plaučiai	0 1 2 3	Vertindami naudokite auskultacijos zonas Vertinimui būtinas bent dviejų zonų pakenkimas. Asimetrijos atveju vertinamos dvi labiausiai pakenktos zonos.

Sunkumo laipsniai: 0-3 lengvas 4-7 vidutinis 8-12 sunkus

5 PREIDAS. Tiriamojo duomenų anketa.

Alfa-1 antitripsino variantų ir koncentracijos ryšys su ikimokyklinio amžiaus vaikų bronchų obstrukcijos sindromu
Versija: 1.0
2016 m. liepos 4 d.

TIRIAMOJO DUOMENŲ ANKETA

Tiriamojo ID

Tėvų/globėjų informavimas, informuotų tėvų/globėjų sutikimas:

Ar abiem tėvams arba globėjams informacija buvo suteikta prieš pradėdant rinkti duomenis?

☐ Taip

Data (MMMM-mm-DD):

Ar informuoto sutikimo forma pasirašyta abiejų tėvų arba globėjų prieš pradėdant rinkti duomenis?

☐ Taip

Data (MMMM-mm-DD):

Įtraukimo kriterijai:

Pasirašyta informuoto sutikimo forma:

☐ Taip

Amžius iki 72 mėnesių (įskaitytinai):

☐ Taip

Klinikiniai bronchų obstrukcijos požymiai (švokštimas ir/arba sausi karkalai ir/arba prailgėjęs iškvėpimas auskultuojant):

☐ Taip

Neįtraukimo kriterijai (pažymėti tinkamus):

☐ Tėvai/globėjai atsisako dalyvauti tyrime;

☐ Tėvai/globėjai negali suteikti informuoto asmens sutikimo dėl bet kokios priežasties;

Nustatyta kita švokštimo priežastis:

☐ Įgimtos kvėpavimo takų anomalijos (bronchomaliacija, kraujagysliniai žiedai, kt.),

☐ Bronchopulmoninė displazija,

☐ Aspiracija,

☐ Cistinė fibrozė,

☐ Svetimkūnis,

Vaikui diagnozuota:

☐ Įgimta širdies yda su cianoze (šuntas iš kairės į dešinę);

☐ Radiologiškai patvirtinta pneumonija įtraukimo į tyrimą metu;

☐ Imunodeficitas,

☐ Neurorauemeninė liga.

Švokštimo klinikinis pobūdis

Ar vaikui pasireiškia švokštimo epizodai peršalimo ligų metu:

☐ Taip ☐ Ne

Ar vaikui pasireiškia švokštimo simptomai ne peršalimo metu:

☐ Taip ☐ Ne

Tiriamąjo duomenys:

Amžius: mėnesiai
Gestacinis amžius: savaitės
Lytis: ☐ Berniukas ☐ Mergaitė
Ūgis: cm
Svoris: kg

Klinikinis įvertinimas:

Švokštimo pradžios data (MMMM-mm-DD):
Hospitalizacija dėl dabartinio švokštimo epizodo: ☐ Taip ☐ Ne
Hospitalizacijos trukmė, jei hospitalizuotas: (d)
Diagnozė: TLK-10 kodas

Požymis	Pirminis įvertinimas	Pakartotinis įvertinimas 3-ią ligos dieną*
Švokštimas	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
Įtraukimai	0 ☐ 2 ☐	0 ☐ 2 ☐
Laiptinių raumenų susitraukimai	0 ☐ 2 ☐	0 ☐ 2 ☐
Oro patekimas	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
O ₂ saturacija	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐
Karščiavimas	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne

Laboratorinių tyrimų rezultatai (jei atlikta)*:

Leukocitai: *10⁹/L Eritrocitai: *10¹²/L
Hemoglobinas: g/L Neutrofilai: *10⁹/L
Limfocitai: *10⁹/L Eozinofilai: *10⁹/L
C-reaktyvus baltymas: mg/L Bendras IgE: IU/L

Tiriamąjo ligos ir gyvenimo anamnezės duomenys:

Ankstesnių švokštimo epizodų skaičius:
Pirmojo švokštimo epizodas (nurodyti amžių mėnesiais):
Ankstesnė hospitalizacija dėl švokštimo epizodo: ☐ Taip ☐ Ne
Jei taip, kiek kartų?

Kliniškai diagnozuotas alerginis rinitas: ☐ Taip ☐ Ne
Kliniškai diagnozuotas atopinis dermatitas: ☐ Taip ☐ Ne
Diagnozuota maisto alergija: ☐ Taip ☐ Ne

Jei taip, išvardinkite maisto produktus, jeigu žinoma, kuriems vaikas alergiškas*:

Sensitizacija (jei atlikta: teigiamas rezultatas žymėkite "Taip", neigiamas – "Ne"):

Specifiniai IgE:		Odos dūrio mėginiai:		Papildoma informacija:
Dulkių erkės	☐ Taip ☐ Ne	Dulkių erkės	☐ Taip ☐ Ne	☐
Žiedadulkės	☐ Taip ☐ Ne	Žiedadulkės	☐ Taip ☐ Ne	
Katė	☐ Taip ☐ Ne	Katė	☐ Taip ☐ Ne	
Šuo	☐ Taip ☐ Ne	Šuo	☐ Taip ☐ Ne	
Pelėsis	☐ Taip ☐ Ne	Pelėsis	☐ Taip ☐ Ne	
Kiti	☐ Taip ☐ Ne	Kiti	☐ Taip ☐ Ne	
Maisto	☐ Taip ☐ Ne	Maisto	☐ Taip ☐ Ne	

Skiepai:

Skiepytas pagal Lietuvos Respublikos vaikų profilaktinių skiepimų kalendorių: ☐ Taip ☐ Ne

Pasyvi imunizacija prieš respiracinį sincitijaus virusą (Palivizumab): ☐ Taip ☐ Ne

Gydymas šio ligos epizodo metu:

Geriamieji kortikosteroidai: ☐ Taip ☐ Ne
 Inhaliuojamieji kortikosteroidai: ☐ Taip ☐ Ne
 Trumpai veikiantys beta-2-agonistai (salbutamolis): ☐ Taip ☐ Ne
 Adrenalino inhaliacijos: ☐ Taip ☐ Ne
 M-cholino blokatoriai (Atrovent, kt.): ☐ Taip ☐ Ne
 Leukotrienų receptorių antagonistai (montelukastas): ☐ Taip ☐ Ne
 Antibiotikai: ☐ Taip ☐ Ne

Jei taip, koks(-ie) antibiotikas(-ai):

Gydymas pastarąjį mėnesį iki šio ligos epizodo: nurodyti medikamentą ir trukmę

Šeimos anamnezė ir namų aplinka:

Ar tiriamasis lanko darželį? ☐ Taip ☐ Ne
 Darželio lankymo pradžia (nurodyti vaiko amžių mėnesiais): ☐ <18 ☐ 18-24 ☐ >24
 Kelintas vaikas šeimoje?
 Kitų vaikų skaičius šeimoje:
 Rūkymas namuose: ☐ Taip ☐ Ne
 Rūkymas vaiko aplinkoje: ☐ Taip ☐ Ne
 Rūko mama: ☐ Taip ☐ Ne
 Rūko tėtis: ☐ Taip ☐ Ne
 Rūko kitas šeimos narys: ☐ Taip ☐ Ne

Jei taip, vidutinis cigarečių skaičius per dieną pastarąjį mėnesį:

Lėtinės ligos šeimoje:

Diagnozuota liga	Pirmos eilės giminaičiui	Antros eilės giminaičiui
Astma:	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne
Alerginis rinitas:	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne
Atopinis dermatitas:	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne
Lėtinė obstrukcinė plaučių liga:	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne
Lėtinė kepenų liga:	☐ Taip ☐ Ne	☐ Taip ☐ Ne

* Pirmos eilės giminaičiai – mama, tėtis, brolis, sesuo;
 Antros eilės giminaičiai - senelis, močiutė, dėdė, teta, pusbrolis, pusseserė.

Alfa-1 antitripsino kraujyje tyrimų rezultatai:

AAT koncentracija:	
AAT fenotipas:	
AAT genotipas:	

Tolesnės ligos eigos duomenys (pildoma praėjus 12 mėnesių apklausiant tiriamojo tėvus/globėjus konsultacijos metu ar telefonu):

Ar vaikui pasireiškia švokštimo epizodai peršalimo ligų metu: ☐ Taip ☐ Ne
 Ar vaikui pasireiškia švokštimas ne peršalimo metu: ☐ Taip ☐ Ne

Švokštimo/dusulio epizodų skaičius:
 Hospitalizacijų dėl švokštimo/dusulio skaičius:

Gydymas:
 (Naudoti vaistai, dozės, gydymo trukmė)

Tyrėjo vardas ir pavardė Parašas Užpildymo data

6 PRIEDAS. speciali sauso kraujo lašo mėginių sugeriamojo popieriaus kortelė (*Alpha-kit*).

NEWBORN SCREENING BLOOD COLLECTION FORM DO NOT USE AFTER JULY 2019	
PRINT CLEARLY DO NOT WRITE IN OR COVER SHADED AREA	
Infant's Last Name: 	☐ Initial Specimen ☐ Repeat Specimen
Infant's First Name: 	☐ Male ☐ Female
AKA: 	☐ Single Birth ☐ Twin [A] or [B] ☐ Other _____
Date of Birth: MMDDYYYY	Time of Birth: (Military Time)
Gestational Age: (Weeks)(Days)	
Date of Specimen: MMDDYYYY	Time of Collection: (Military Time)
Infant's Age When Collected: ☐ Less Than 24 hours ☐ More Than 24 hours	
Infant's Medical Record #: 	Birth Weight: (Grams)
Mother's Name and Address: Last: _____ Address: _____ Zip: _____ Tel. #: () _____ First: _____ Apt. #: _____ Date: _____	
Mother's Date of Birth: MMDDYYYY	☐ Homebirth ☐ Adoption ☐ Foster Care
Hospital Name and Address: 	Maternal HBsAg Test Result: ☐ Pos. ☐ Neg. ☐ Unk.
City: 	HIV Testing: Prior Maternal: [A] [B] [C] [D] In-Hospital: [E] [F] [G]
Infant's Primary Care Physician: Name: _____ Address: _____ Zip: _____ Tel. #: () _____	2nd Prenatal Test? [Y] or [N] Hospital of Birth? ☐ Yes ☐ No
Notes: 	Physician's License #:
Form Completed By: _____	
Specimen Drawn By: _____	
Previous Lab ID #: 	
Lab I.D.: SN 47 8984866	
SEE REVERSE SIDE FOR INSTRUCTIONS SN Lab I.D. 47 8984866 SATURATE ALL CIRCLES COMPLETELY	

Relevance of the problem

Pre-school wheezing syndrome is one of the most frequent and so far little-studied children's health problem, which affects more than 50% of children under the age of six (1) and strongly affects the health and quality of life of the child and his family, increasing the use of health care system. Wheezing can be acute, intermittent (recurrent), or chronic and can be caused by a variety of causes, including anatomical abnormalities and environmental factors. Genetic factors may predispose young children to wheezing with respiratory viral infections (2). Previous studies have shown that young children with the ORMDL3 (sphingolipid biosynthesis regulatory risk allele) and the GSDMB (Gasdermin B) risk allele are at increased risk of wheeze (3,4). It is thought that wheezing in preschool children is a heterogeneous disorder and that only some of these children persist with wheezing and develop into bronchial asthma (BA) and possibly other obstructive airway diseases in later life (5). Recent research has focused on the phenotypes and endotypes of wheezing syndrome as the most direct route to personalised medicine and effective management of this syndrome (6–8). The long-term prognosis of wheezing syndrome, its evolution into bronchial asthma, chronic obstructive airway disease, etc. in older children and adults are aspects of this problem. To date, there are no reliable prognostic factors to predict which children will experience recurrent episodes of wheezing at the age of 6-7 years and which will continue to wheeze at an older age, and how the prognosis of wheezing in early childhood is affected by different therapeutic interventions.

The search for diagnostic and prognostic (mid- to long-term) markers of wheezing syndrome in young children depends on a number of factors, including: clinical features (9), type of virus (RV vs RSV) (10), family history, especially of atopic diseases (11), eosinophilia of peripheral blood and/or nasal secretions (12), total and specific immunoglobulin E (13), nitric oxide concentration in exhaled breath (14), various fractions of the exhaled breath condensate (15,16) and others.

Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD), which is one of the most common rare health conditions in Europe, is known to manifest clinically in a variety of symptoms, but the liver and lungs are most commonly affected (17). On the other hand, today less than 10% of likely affected individuals are diagnosed with AATD (18). The link between AATD and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been demonstrated. Both homozygous and heterozygous frequencies of the mutant alleles Pi*Z and Pi*S are significantly higher in

COPD patients compared to their healthy adult peers (19). The association of AATD mutant genotypes with COPD is further supported by the fact that in the presence of these genotypes, COPD, which is currently considered to be exclusively a disease of the elderly, manifests itself at a significantly younger age in adulthood (20).

Epidemiological and long-term population-based observational studies in neonatal cohorts have confirmed that recurrent wheezing in early childhood is associated with recurrent or persistent respiratory symptoms in adulthood, and with a higher prevalence of bronchial asthma (21) and COPD (22,23).

On the other hand, AATD was statistically significantly associated with an early diagnosis of COPD in adulthood and with faster disease progression, earlier disability and shorter life expectancy (24,25).

AATD is the main and so far only proven heritable risk factor for COPD and emphysema (26).

Further studies have shown that AATD mutant variants such as PiMZ are associated with wheezing episodes, but no attempts have yet been made to link wheezing syndrome phenotypes to AATD mutant genotypes and to identify AATD-dependent wheezing syndrome phenotypes/endotypes in pre-school children that are characteristic of the chronic respiratory diseases in older children and adults.

Despite the fact that in a retrospective evaluation of the first cohort of AATD newborns in Sweden (neonates born in 1973 and selected during the newborn screening) no association was observed between AATD and the prevalence of bronchial asthma or other respiratory diseases in older children, AATD genotypes became the target of our studies in a cohort of wheezing pre-school children. We were unable to find other prospective studies that attempted to link different AATD genotypes to phenotypes/endotypes of wheezing syndrome in preschool children, which could be a prognostic marker for COPD or even the first clinical manifestation of COPD. Different AATD genotypes could be associated with a different risk of a first episode of wheezing, more or less respiratory failure during the wheezing episode, more or less frequent recurrence of these episodes in pre-school age, and different risk of chronic diseases in older children and adults.

Demonstrating an association between AATD homozygous/heterozygous mutant genotypes and wheezing syndrome could lead to improved bronchial asthma and COPD risk management, and to early targeted prevention/treatment approaches to ensure both early child development and healthy ageing, which is a priority of the World Health Organisation (WHO).

The dissertation is innovative and novel in terms of its objectives, research methodology and results, and their practical application.

The research focused on a common but so far very fragmented health problem in pre-school children - recurrent wheezing syndrome and its association with bronchial asthma in adolescence and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in adulthood. Epidemiological studies to date have shown that one in three children have at least one episode of airway obstruction, i.e. wheezing breathing, before their third birthday, usually during an acute respiratory infection (27). 30% of these children have recurrent episodes of wheezing later.

Previous long-term follow-up studies in neonatal cohorts have confirmed that wheezing syndrome in pre-school children is associated with later diagnosis of bronchial asthma and COPD, but it is still unknown what causes one wheezing child to be diagnosed with COPD while another to have a sporadic episode of wheezing or, if repeated over several episodes, to have a permanent resolution by the time he or she reaches pre-school age. The aim of our study was to deconstruct the wheezing syndrome by trying to look for phenotypes/endotypes of wheezing associated with one or another chronic disease, but not retrospectively, as has been done before, by looking at the spontaneous course of recurrent wheezing and its evolution into chronic respiratory disease, but prospectively assessing the frequency of known markers of chronic obstructive respiratory disease in older children or adults, in our case alpha-1 antitrypsin genotype variants, in a population of wheezing preschool children and in distinct sub-populations of the wheezing syndrome (groups of clinical phenotypes).

The research was carried out in the non-specialised ALSPAC (*The Avon Longitudinal Study of Parents and Children*, (Bristol, UK) and the specialised PresWeezAging LT (*Cohort of Preschool Children with Wheezing Syndrome for the Study of Aging-Related Diseases*, LT). The Lithuanian cohort is a cohort of Lithuanian preschool children with wheeze syndrome that we have collected. ALSPAC is a multi-generational, geographically based, non-specialised cohort study of 14,541 pregnant women and their subsequent child(ren) enrolled between 1990 and 1992 in the Avon region of the United Kingdom. A number of studies have been undertaken to assess the representative nature of the ALSPAC sample that was completing questionnaires or attending the Children in Focus clinic with (a) the total Avon area population, and (b) the whole of Great Britain, in 1991. The population of parents and children living in the study area in 1970 was broadly similar to

that of the rest of Great Britain. Data from the 1991 Census was used to compare the population of mothers with babies under 1 year of age living in the Avon area with the population of the whole of Great Britain. Thus the mothers of infants in Avon were slightly more likely than those in the rest of Britain to live in owner occupied accommodation, to have a car available to the household and to be less likely to have one or more persons per room and be non-white. Thus, in order to have a representative sample and to compare the data with the rest of the British population, this study was slightly under-represented in terms of deprived families (renting, car-less, single or unmarried cohabitants) and under-represented in terms of ethnic minorities.

The Lithuanian cohort was a specialised cohort consisting of only preschool children with wheezing syndrome and a control group (219 children in total), collected in 2019-2023. The two-stage approach allowed us to assess the association of AAT mutant genotypes not only with wheezing syndrome phenotypes, but also with chronic obstructive pulmonary diseases, both directly (wheezing syndrome plus AAT mutant genotype vs. bronchial asthma in adolescence) and indirectly (wheezing syndrome plus AAT mutant genotype vs. chronic obstructive pulmonary disease in adulthood).

Our study found a statistically significant association between SERPINA1 gene polymorphisms and wheezing phenotypes and bronchial asthma. On the other hand, the association of the AAT mutant Pi*Z and Pi*S genotypes not only with bronchial asthma but also with COPD, which until now has been exclusively an adult disease, usually diagnosed after the age of 50 years. Despite the fact that long-term cohort studies in children have previously confirmed that people with wheezing syndrome in early childhood are two or more times more likely to develop COPD in adulthood, COPD in children has been undiagnosed until recently, possibly by mistakenly labelling the symptomatology as childhood chronic (obstructive) bronchitis, a chronic unspecified respiratory disease. Our finding of an association between SERPINA1 gene polymorphisms, wheezing syndrome phenotypes and chronic respiratory diseases in older people allows us to consider AAT mutant genotypes not only as prognostic markers, but also, in COPD, as the first clinical manifestation of COPD in early childhood. The fact that children with the Pi*Z allele of AAT and with wheezing syndrome had reduced AAT levels during the acute airway obstruction episode, but that the reduction in AAT levels did not lead to more severe clinical respiratory impairment in this age group, suggests that the disease mechanisms and the respiratory compensatory reserves are different in children and adults, and are not solely governed by the quantitative indices. Further studies are certainly needed to uncover mechanisms other than AAT levels that may contribute to the

aetiopathogenesis of chronic respiratory diseases in AAT homo- and heterozygous mutant genotypes.

The results of our research have important translational value. Children with wheezing syndrome, irrespective of age, should be screened for AATD, both by alpha-1 antitrypsin levels and phenotyping, as this may influence not only the course of the wheezing syndrome (acute, intermittent, chronic), but also the morbidity of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Families of children with the AAT mutant genotype (both homozygous and heterozygous variants) should be aware of and adhere to the requirements for prevention specific to respiratory obstructive diseases, such as the complete elimination of active and passive smoking, including e-cigarettes, the control of air pollution in the home and in educational establishments, and the responsible choice of the child's future occupation and working environment. Thus, our findings suggest that specific prevention of COPD, a previously exclusively chronic disease of older adults, should start in early childhood.

Purpose of the work

To investigate the frequency of alpha-1 antitrypsin genotypes and SERPINA1 gene polymorphisms in the population-based long-term follow-up *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) cohort in Bristol, UK and in the *Lithuanian Cohort of Preschool Children with Wheezing Syndrome* (PresWeezAging LT) cohort and to assess the association of wheezing syndrome with the incidence of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

Objectives of the work

1. To investigate the frequency of SERPINA1 gene polymorphisms in a population-based cohort of ALSPAC children and to assess the association between alpha-1-antitrypsin variants and the phenotypes of wheezing syndrome in preschool children.
2. To investigate the association of SERPINA1 gene polymorphism-dependent phenotypes of wheezing syndrome in preschool children with school-age bronchial asthma.
3. To collect a specialized cohort of Lithuanian preschool children with wheezing syndrome for long-term studies of diseases associated with human aging (PresWeezAging LT) and to study the frequency of

alpha-1 antitrypsin deficiency Pi*Z and Pi*S alleles in a specialized cohort of wheezing children and compare it with the frequency in children without respiratory obstructive diseases (control) and among adults with COPD.

4. In children up to 72 months of age, during an episode of wheezing, investigate alpha-1 antitrypsin levels in the blood to assess their possible association with the severity of respiratory distress.
5. To assess the possible association of wheezing phenotypes in preschool children dependent on SERPINA1 gene polymorphisms with bronchial asthma in school-aged children and chronic obstructive pulmonary disease in adults.

Methods of research

The material and data for the biomedical study was collected in several stages: firstly, data were collected from the population-based ALSPAC (The Avon Longitudinal Study of Parents and Children) cohort. Next, data were collected in 2019-2023 in a prospective case-control study conducted at the Institute of Clinical Medicine, Department of Paediatric Diseases, Vilnius University Faculty of Medicine. Children with wheezing syndrome were also enrolled in Kaunas, Telšiai, Kelme, Kėdainiai and Utena.

ALSPAC cohort study group

Study sample and selection of subjects

The Avon Longitudinal Study of Children and Parents (*ALSPAC*) was designed to understand how genetic and environmental characteristics influence the health and development of parents and children. It is a longitudinal, population-based birth cohort study that included pregnant women living in the Avon area, UK. The study included 14 541 pregnant women with an estimated date of birth between April 1991 and December 1992. 13 988 live births survived to one year of age. Additional participants (N=713) were enrolled at later stages, bringing the total number of subjects to 14701, of whom 7964 had all the data required for the study.

Bioethical requirements

Permission was obtained from the ALSPAC Ethics and Legal Committee and the local Research Ethics Committees to retrieve and use the relevant data.

Details of the ALSPAC methodology have been published separately and are available at: <http://www.bristol.ac.uk/alspac>.

The study's website provides details of all available data, which can be found in a comprehensive database (<http://www.bris.ac.uk/alspac/researchers/data-access/data-dictionary/>).

Data collection

According to the objective, the database was searched for participants with data on wheezing syndrome, physician-diagnosed bronchial asthma, AAT genotypes and SERPINA1 gene polymorphisms.

Data on childhood wheezing were collected using questionnaires completed by the parents approximately once a year, at several time intervals at the expected age of the child (6/18/42/54/57/65/81 and 103 months), starting at 6 months of age. Lung function and information on the diagnosis of bronchial asthma were measured at two separate time points, at approximately 8 and 15 years of age.

Based on the classification of the wheezing syndrome phenotype, the subjects were divided into the following wheezing phenotypes: (i) never/infrequent wheeze (59.9%) with approximately 10% prevalence of wheezing at 6 months and decreasing prevalence of sporadic wheeze thereafter, including participants who never wheezed; (ii) preschool-onset remitting wheeze (18.7%) with a moderate prevalence of wheeze up to 18 months and decreasing to less than 10% prevalence from 69 months; (iii) midchildhood-onset remitting wheeze (7.5%) with peak prevalence of wheeze at 54 months gradually decreasing to infrequent by 128 months; (iv) school age-onset persisting wheeze (4.3%) had a low prevalence of wheeze up to 42 months then increasing rapidly to a peak prevalence of at 103 months and then decreasing to moderate prevalence at 198 months; (v) late childhood-onset persisting wheeze (4.7%) with low prevalence during the first year of life and increasing rapidly to a peak prevalence of 71% at 166 months; (vi) continuous wheeze (4.9%) with a moderate prevalence of wheeze at 6 months and moderate to high prevalence thereafter.

The SERPINA1 gene polymorphisms (rs6647, rs11832, rs17580, rs709932, rs1243160, rs2854254, rs8004738, rs17751769, rs28929470, rs28929474) were selected on the basis of a previous study in adults, which had found that these SNPs were associated with an increased risk of COPD or an effect on lung function (234).

Research methods

Genotyping was carried out at the Wellcome Trust Sanger Centre, Cambridge, United Kingdom, and Laboratory Corporation of America, Burlington, NC. Illumina HumanHap 550 array (Illumina, San Diego, California) was used.

Subject exclusion criteria included: sex mismatches, minimal or excessive heterozygosity, disproportionate levels of individual missingness ($>3\%$), cryptic relatedness measured as a proportion of identity by descent ($IBD > 0.1$), and insufficient sample replication ($IBD < 0.8$).

Evidence of population stratification was assessed using multidimensional scaling analysis and was compared with HapMap II (release 22); subjects of non-European descent were removed.

Only SNPs with at least 1% allele frequency, a call rate of at least 95%, and non-violating Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 5 \times 10^{-7}$) were retained.

Autosomal genotypic data were imputed with Markov Chain Haplotyping software (MACH v.1.0.16(256)) and phased haplotype data from CEU subjects (HapMap release 22, phase II NCBI B36, dbSNP 126. Details of the GWAS data generation process are available online: <http://www.bristol.ac.uk/media-library/sites/alspac/migrated/documents/gwas-data-generation.pdf>

Statistical analysis methods for ALSPAC cohorts

Tasks were formulated for biostatisticians at the ALSPAC Research Center and statistical data processing was performed. The data were processed using the statistical software package R (version 3.4.2, 2017-09-28) (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

We used poLCA for R (Linzer, Drew A. and Jeffrey Lewis. 2013. "poLCA: Polytomous Variable Latent Class Analysis." R package version 1.4 (<http://dlinzer.github.com/poLCA>)) to identify different wheezing phenotypes based on questionnaire responses. A six-class model was chosen because it was previously the most optimal model and the analysis yielded the lowest AIC values. Multivariate logistic regression (Wald statistic) was used to analyse the association of different single nucleotide polymorphisms of the SERPINA1 gene with wheezing phenotypes and physician-diagnosed bronchial asthma at age 15 years.

A two-sided p-value < 0.05 was considered significant.

Study sample and selection of subjects

The biomedical research authorisation was granted for 7 years (from 28 September 2016 to 1 April 2023). The study was planned to enrol 150 subjects in the main group (MG) and up to 60 subjects in the control group (CG) throughout the study period. A total of 150 children aged up to 72 months with bronchial obstruction syndrome were included in the biomedical study over six years. 5 subjects had to be excluded: 3 due to haemolysis in the sample and 2 due to incorrect sample collection. Thus, 145 children with bronchial obstruction syndrome were included as the main group of subjects and 74, also under 72 months of age, as controls.

The collection of the control group was smooth and all samples were suitable. The number of children included in the study was also influenced by the quarantine imposed due to the COVID-19 pandemic, which resulted in a significant decrease in both outpatient consultations and hospitalisations. Considering that the dissertation was able to practically recruit the planned cohort of subjects, the plan has been met by 100% in terms of the number of children to be tested.

Participation was open to all children up to 72 months of age who presented for consultation or treatment by a paediatric pulmonologist or paediatrician for wheezing syndrome, either as an outpatient or an inpatient. The wheezing episode may have been acute, a first-ever occurrence, or the child may have had a previous wheezing episode(s) in his/her lifetime and presented with recurrent wheezing syndrome at that time. They needed blood tests for reasons unrelated to the biomedical investigation, but only for medical indications. The blood could have been either capillary or venous and was taken in a tube with EDTA.

The control group consisted of 74 preschool-aged (72 months) children with no concomitant respiratory diseases who had been diagnosed with various surgical pathologies (abdominal wall and inguinal hernias (52.7%), port-wine spots (14.9%), benign tumours (8, 1%), vascular malformations (8.1%), cystic lesions (6.8%), haemorrhoidal nodules (2.7%) and other isolated cases (6.8%)) were hospitalised and required a blood sample for general clinical indications in preparation for surgery.

A total of 145 children with acute wheezing syndrome in the main group were enrolled in the study, and an additional 74 children without respiratory problems who were hospitalised for various surgical pathologies and required a blood sample in preparation for surgery were recruited as a control group.

The study was non-commercial and there was no financial gain for the subjects and researchers involved.

In Vilnius, I was informed by the doctor in charge of the ward about children hospitalised with wheezing syndrome. Then I carried out the examination, interviewing and screening of the subjects and the provision of information to the parents, as well as the dry blood spot samples (Alpha-kit) (appendix 6) from the residual blood. In other cities, other responsible and trained doctors were assigned.

This study is not representative of the general population, as the target group of subjects complaining of bronchial obstruction syndrome (bronchial wheezing) was selected, but it is certainly possible to draw some conclusions that are specific to the general population and to make epidemiological calculations, especially with regard to the genotypes, as the significance of the factors that are present in the course of life, when the person is born with the disorder, and that have an impact on the course and the severity of the disease. Some of the subjects were from other Lithuanian cities in different regions (Klaipėda, Telšiai, Kėdainiai, Utena, Kaunas), so the study is multicentric, prevents misinterpretations and allows us to highlight the most important regularities and trends, and includes a broader clinical picture of wheezing children in Lithuania, not limited to the residents of the capital city alone.

Bioethical requirements

The biomedical study "Relationship of alpha-1 antitrypsin variants and levels to acute bronchial obstruction syndrome in preschool children" was conducted with the permission of the Lithuanian Bioethics Committee on 28 September 2016, No L-16-07/1, No L-16-07/2, No L-16-07/3 (Annexes 1-3).

Before the inclusion of the children in the study, the purpose and conduct of the study were fully explained to the parents/guardians. Parents/guardians who agreed to participate were asked to sign a prepared informed consent form.

Data collection

After the parents/guardians agreed and signed the consent form to participate in the study (in two copies) during the initial visit, one copy was left with the parents/guardians, and the other was kept by the biomedical study researchers. After the parents/guardians signed the person's information and consent form to participate in the study, demographic (date of birth, gender, date of inclusion in the study), anthropometric (height, weight) information about the

study participant was collected, the participant was examined and evaluated clinically without applying invasive research methods (clinical respiratory scoring using the Pediatric Respiratory Assessment Measure (PRAM) (Appendix 4) rating scale, body temperature). By meeting the inclusion criteria, the participant was enrolled in the study.

During the initial visit, information about the course of the participant's recent wheezing episode was collected and recorded in a special questionnaire (Appendix 5) (date of onset of wheezing, hospitalization, duration of hospitalization, clinical diagnosis, whether it is the first episode of wheezing in life). Data on the subject's disease anamnesis, life anamnesis (clinically expressed allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergy), vaccinations, and family anamnesis were collected. Data from previous allergological tests (skin prick samples and specific immunoglobulin E for inhalant allergens) were collected (if performed). Only patients requiring blood sampling for medical indications unrelated to biomedical testing were included. If the blood test was not performed, it was used as an exclusion criterion and the subject was not included in the study. Dry blood spot samples were taken from the remaining blood in a special absorbent paper pad (Alpha-kit) (Appendix 6). Properly prepared blood sample cards, within 14 days, were sent to the laboratory of the Department of Genetics and Clinical Immunology of the National Institute of Tuberculosis and Lung Diseases in Warsaw, Poland (Department of Genetics and Clinical Immunology, National Institute of Tuberculosis and Lung Diseases, 26 Plocka str., 01-138 Warsaw, Poland, phone +48 22 43 12 158). There, alpha-1 antitrypsin concentration, phenotyping, genotyping and, if necessary, DNA sequencing were performed. The participant's parents/guardians were informed after receiving the test results.

Research methods

A nephelometric method (Image 800 Immunochemistry System, Beckman Coulter) was used to determine AAT concentration from a spot of dry blood.

Analysis of the AAT phenotype in dried blood spot material was performed by isoelectrofocusing (IEF) using a Hydragel 18A1AT Isofocusing kit (Hydrasys Focusing, Sebia) and a Sebia HydraSys electrophoresis platform (235).

The two most common SERPINA1 gene variants, PI*Z and PI*S, were identified using dried blood spot material and real-time PCR. Genomic DNA was extracted from a spot of dried blood using the commercial Extract-N-Amp Blood PCR Kits (Sigma-Aldrich) or the Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx Ltd.).

The genetic material in the eluate was used directly for AAT genotyping and sequencing without DNA purification. Identification of PI*Z and PI*S alleles was performed in a single reaction by real-time PCR (LightCycler 480 II instrument, Roche Diagnostics Ltd.) using 3'-minor groove (MGB) hydrolyzing probes complementary to wild-type and mutant for variants combined with two different fluorescent dyes - FAM and VIC.

A direct Sanger sequencing method was used to identify rare AAT variants. Sequencing of exons II-V of SERPINA1 was performed using a 16-capillary 3130xl genetic analyzer (Genomed, Poland) (236).

The severity of wheezing, which was categorized as mild, moderate, and severe, was calculated using the Pediatric Respiratory Assessment Scale (PRAM). We looked for an association between AAT concentration and wheezing severity and between AAT genotypes and wheezing severity.

Based on the anamnesis and objective examination data, a common cold was diagnosed. Parents' complaints (fever, runny nose, cough) and objective examination data were evaluated according to the algorithm approved by the hospital, and patients with wheezing syndrome were divided into two groups - children wheezing with common cold and children wheezing without common cold.

Pi*Z and Pi*S allele frequencies for comparison with COPD patients were taken from the Central and Eastern European AAT network established under the LPP Leonardo da Vinci EU program (2011-1-PL-LEO04-197151) "Implementation of best medical practice standards in patients , with hereditary alpha-1 antitrypsin deficiency in Central Eastern Europe". In 2012 October-2013 January dry blood spot samples of 328 COPD patients were taken. When determining the frequency of PI*S and PI*Z alleles in the general population, the data were compared with two previous epidemiological studies conducted on the population of Lithuania (N = 2491) (62,63).

Methods of statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20.0 and Microsoft Excel 365. Continuous and categorical variables were presented as median (interquartile range (IQR) and numbers (%), respectively). Continuous variables were compared using the Mann-Whitney U or Friedman test, and the χ^2 test or Fisher's exact test was used to compare categorical variables, and a two-sided p value < 0.05 was considered significant.

The frequency of Pi*Z and Pi*S is expressed as the frequency per thousand alleles with 95% CI (e.g. 3 Pi*Z alleles are found in 74 subjects, i.e. 148 alleles, then the frequency per thousand alleles is calculated as follows: $3 \times 1000/148 = 20.27$).

RESULTS

ALSPAC Cohort

Characteristics of the study group

In the ALSPAC cohort, different wheezing phenotypes were identified based on questionnaire responses. According to those wheezing phenotypes, children were distributed as follows: the largest subgroup of children was children with never/infrequent wheeze (n = 5308, 66.64%, Table 1). There were significantly more girls than boys in this subgroup. The second largest subgroup was Preschool-onset remitting wheeze (n = 1326, 16.64%). The distribution of children with the remaining wheezing phenotype can be seen in Table 1.

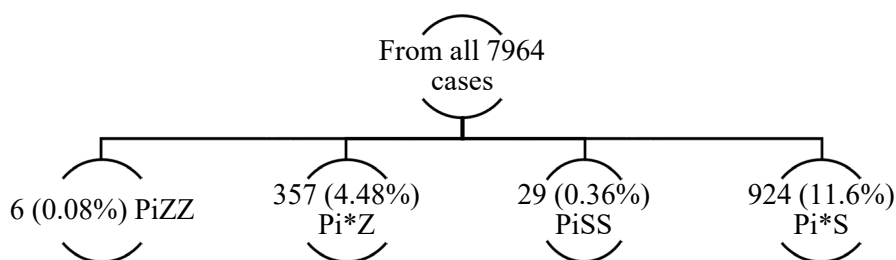
Table 1. Distribution of wheezing phenotypes among children from the ALSPAC cohort.

Wheezing phenotype	N total	Sex, N (%)		OR (95% CI) ^a	p value
		Male	Female		
Never/infrequent wheeze	5308	2524 (62.1)	2784 (71.4)	0.567 (0.505-0.636)	<0.001
Preschool-onset remitting wheeze	1326	753 (18.5)	573 (14.7)	1.614 (1.354-1.925)	<0.001
Midchildhood-onset remitting wheeze	405	256 (6.3)	149 (3.8)	1.962 (1.523-2.527)	<0.001
School-age-onset persisting wheeze	222	114 (2.8)	108 (2.8)	0.972 (0.672-1.406)	0.882
Late childhood-onset persisting wheeze	287	163 (4)	124 (3.2)	1.575 (1.169-2.122)	0.002
Continuous wheeze	416	253 (6.2)	163 (4.2)	2.146 (1.651-2.789)	<0.001
Total	7964	4063 (51.0)	3901 (49.0)		

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

a Odds ratio, 95% confidence interval (Univariate logistic regression, Wald statistic)

The distribution of alpha-1 antitrypsin genotypes and deficient Pi*Z and Pi*S alleles in the ALSPAC cohort is shown in Figure 1. Six of 7964 (0.08%) children were homozygous and 357 (4.48%) heterozygous for the Pi*Z (rs28929474) AAT genotype. 29 (0.36%) had homozygous PiSS and 924 (11.6%) heterozygous Pi*S (rs17580) AAT genotype.



1 Figure. Distribution of alpha-1 antitrypsin genotypes and mutant Pi*Z and Pi*S alleles in the ALSPAC cohort.

Out of all 7964 selected subjects, 3835 (48.2%) cases had data on the diagnosis of bronchial asthma (BA) at the age of 15 years. We divided these children into two groups: children who had no anamnesis of wheezing syndrome - 2596 cases and children with anamnesis of wheezing syndrome - 1239 cases. In the group without an anamnesis of wheezing syndrome, 309 (11.9%) children had a physician-diagnosed bronchial asthma at age 15 years, and in the group with a anamnesis of wheezing syndrome, 587 (48%) children had a physician-diagnosed bronchial asthma at age 15 years (2 figure).

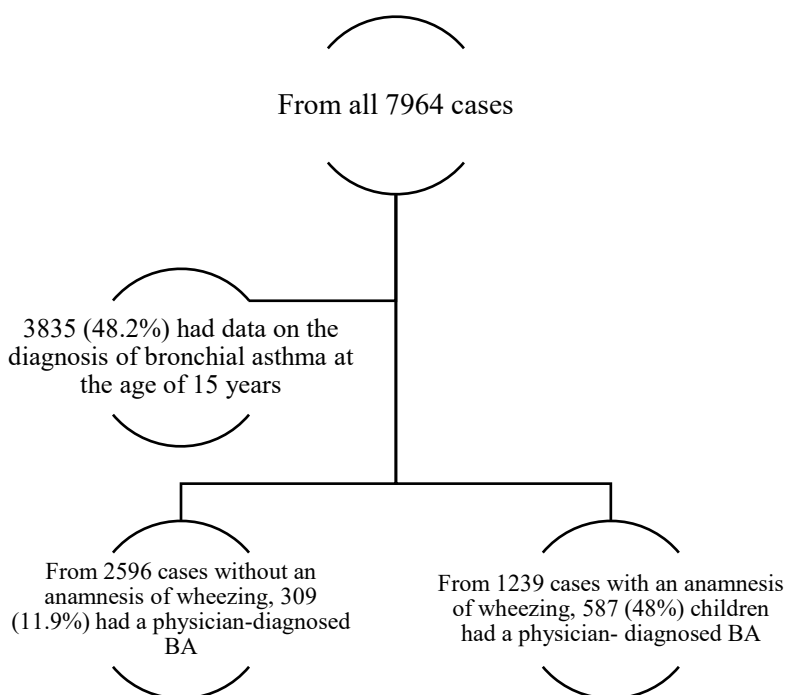


Figure 2. Distribution of children in the ALSPAC cohort according to anamnesis of wheezing syndrome and diagnosis of BA at age 15 years.

Single nucleotide polymorphisms of the SERPINA1 gene among children with bronchial asthma

Based on data on physician- diagnosed bronchial asthma, the odds ratio (OR) and the risk of developing BA at age 15 years depending on a given SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms were calculated.

Among 3835 cases with data about physician-diagnosed asthma, two polymorphisms showed association with childhood bronchial asthma at age 15: heterozygous rs17751769 - OR 1.273 (1.076-1.506) ($p<0.05$) and homozygous rs709932 - OR 1.710 (1.067 -2.742) ($p<0.05$) (Table 2).

Table 2. Distribution of SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms according to physician-diagnosed bronchial asthma at age 15, N=3835

SERPINA1 SNP	Genotype	N total	Doctor diagnosed asthma, N (%)		OR (95% CI) ^a	P value
			No	Yes		
rs6647	AA	2334	1795 (76.9)	539 (23.1)		
	AG	1305	993 (76.1)	312 (23.9)	1.046 (0.892-1.227)	0.578
	GG	196	151 (76.1)	45 (23.0)	0.992 (0.701-1.403)	0.966
rs11832	CC	936	711 (76.0)	225 (24.0)		
	TC	1911	1445 (75.6)	466 (24.4)	1.019 (0.848-1.223)	0.839
	TT	988	783 (79.3)	205 (20.7)	0.827 (0.667-1.025)	0.083
rs17580	TT	3381	2581 (76.3)	800 (23.7)		
	TA	441	346 (78.9)	95 (21.5)	0.885 (0.696-1.126)	0.323
	AA	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0.322 (0.041-2.523)	0.281
rs709932	CC	2763	2129 (77.1)	634 (22.9)		
	CT	992	757 (76.3)	235 (23.7)	1.042 (0.878-1.237)	0.633
	TT	80	53 (66.2)	27 (33.8)	1.710 (1.067-2.742)	0.025
rs1243160	GG	2539	1935 (76.2)	604 (23.8)		
	GA	1157	892 (77.1)	265 (22.9)	0.951 (0.807-1.122)	0.556
	AA	137	110 (80.3)	27 (19.7)	0.786 (0.511-1.209)	0.274
rs2854254	CC	1605	1229 (76.6)	376 (23.4)		
	TC	1718	1298 (75.6)	420 (24.4)	1.057 (0.901-1.240)	0.491
	TT	512	412 (80.5)	100 (19.5)	0.793 (0.619-1.015)	0.066
rs8004738	AA	950	713 (75.1)	237 (24.9)		
	GA	1913	1453 (76.0)	460 (24.0)	0.952 (0.795-1.140)	0.596
	GG	972	773 (79.5)	199 (20.5)	0.774 (0.625-0.959)	0.019
rs17751769	GG	1352	1069 (79.1)	283 (20.9)		
	GA	1848	1382 (74.8)	466 (25.1)	1.273 (1.076-1.506)	0.004
	AA	635	488 (76.9)	147 (23.1)	1.137 (0.907-1.426)	0.263
rs28929470	GG	3792	2906 (76.6)	886 (23.4)		
	GA	42	32 (76.2)	10 (23.8)	1.024 (0.501-2.093)	0.946
	AA	1	1 (100.0)	0 (0.0)	NA	0.958
rs28929474	CC	3652	2806 (76.8)	846 (23.2)		
	CT	180	131 (72.8)	49 (27.2)	1.240 (0.885-1.737)	0.210
	TT	3	2 (66.7)	1 (33.3)	1.658 (0.150-18.311)	0.680

^aOdds ratio, 95% confidence interval (Multivariate logistic regression, Wald statistic)

Distribution of SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms among wheezing phenotypes

To determine the association between wheezing phenotypes and SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms, the relative risk (RR) of having a certain wheezing phenotype depending on the SNP was calculated.

Seven out of 10 VNPs selected in the study were associated with three wheezing phenotypes: (i) rs11832, rs17580 (PiSS), rs709932 and rs1243160 were all associated with Preschool-onset remitting wheeze, with a 1,2- to 2,7 fold increase in the risk of developing this wheezing phenotype; (ii) rs8004738 and rs17751769 were associated with late childhood onset persisting wheeze, increased the risk of this wheezing phenotype almost 3-fold (RR- 2,921); (iii) rs6647 and rs709932 were associated with Continuous wheeze, increasing the risk up to 2,5- fold. We did not find SNPs clustered around a single wheezing phenotype, but as many as four SNPs were associated with Preschool-onset remitting wheeze (Table 3 and Figure 3).

Table 3. Distribution and relative risk of SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms among childhood wheezing phenotypes.

SERPINA1 SNP ^a	Genotype	Total	Never/infrequent wheeze			Preschool-onset remitting wheeze			Midchildhood- onset wheeze			School-age-onset persisting wheeze			Late childhood- onset wheeze			Continuous wheeze		
		N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
rs6647	AA	4828	3203	66.3	805	16.7	-	243	5.0	-	143	3.0	-	165	3.4	-	269	5.6	-	-
	AG	2739	1849	67.5	452	16.5	1.073	139	5.1	1.006	67	2.4	0.847	114	4.2	1.304	118	4.3	0.856	-
rs11832	GG	397	256	64.5	69	17.4	1.330	23	5.8	1.206	12	3.0	1.123	8	2.0	0.729	29	7.3	1.665*	-
	CC	1927	1304	67.7	311	16.1	-	92	4.8	-	52	2.7	-	75	3.9	-	93	4.8	-	-
rs17580	TC	3962	2598	65.6	667	16.8	1.196*	211	5.3	1.258	115	2.9	1.128	151	3.8	0.939	220	5.6	1.317	-
	TT	2074	1405	67.7	348	16.8	1.275*	102	4.9	1.198	55	2.7	1.026	61	2.9	0.657	103	5.0	1.168	-
rs709932	TT	7004	4656	66.5	1171	16.7	-	358	5.1	-	201	2.9	-	254	3.6	-	364	5.2	-	-
	TA	924	632	68.4	144	15.6	0.900	45	4.9	0.885	21	2.6	0.769	32	3.5	0.957	50	5.4	1.006	-
rs1243160	AA	29	15	51.7	10	34.5	2.679*	2	6.9	1.677	0	0.0	0.001	1	3.4	1.656	1	3.4	0.849	-
	CC	5744	3861	67.2	943	16.4	-	300	5.2	-	151	2.6	-	198	3.4	-	291	5.1	-	-
rs2854254	CT	2068	1354	65.5	357	17.3	1.212*	96	4.6	0.899	64	3.1	1.215	85	4.1	1.035	112	5.4	1.233	-
	TT	152	93	61.2	26	17.1	1.452	9	5.9	1.380	6	3.9	2.301	5	3.2	0.689	13	8.6	2.530*	-
rs8004738	GG	5204	3487	67.0	844	16.2	-	263	5.1	-	151	2.9	-	188	3.6	-	271	5.2	-	-
	GA	2456	1613	65.7	431	17.5	1.244*	129	5.3	1.255	63	2.6	0.924	90	3.7	0.806	130	5.3	1.140	-
rs17751769	AA	300	205	68.3	50	16.7	1.222	13	4.3	1.170	8	2.7	0.975	9	3.0	0.709	15	5.0	1.242	-
	CC	3322	2220	66.8	544	16.4	-	185	5.6	-	94	2.8	-	109	3.3	-	170	5.1	-	-
rs28929470	TC	3587	2386	66.5	596	16.6	0.937	173	4.8	0.786	97	2.7	1.008	146	4.1	1.272	189	5.3	1.012	-
	TT	1052	700	66.5	185	17.6	0.968	47	4.5	0.692	31	2.9	1.142	32	3.0	0.948	57	5.4	1.009	-
rs28929474	AA	2038	1367	67.1	339	16.6	-	115	5.6	-	47	2.3	-	71	3.5	-	99	4.9	-	-
	GA	3989	2653	66.5	662	16.6	1.172	202	5.1	0.840	124	3.1	0.999	145	3.6	1.735	203	5.1	0.985	-
rs28929474	GG	1937	1288	66.5	325	16.8	1.212	88	4.5	0.945	51	2.6	1.017	71	3.7	2.921*	114	5.9	1.231	-
	GA	3890	2580	66.3	633	16.3	0.996	211	5.4	1.260	125	3.2	1.159	140	3.6	1.594	201	5.2	1.041	-
rs28929470	AA	1381	921	66.7	242	17.4	1.205	71	5.1	1.023	27	2.0	0.650	55	4.0	2.810*	65	4.7	0.895	-
	GG	7871	5249	66.7	1310	16.6	-	401	5.1	-	216	2.7	-	286	3.6	-	409	5.2	-	-
rs28929474	GA	95	58	63.0	16	17.4	1.154	4	4.3	0.810	9	2.5	2.752	1	1.1	0.350	7	7.6	1.847	-
	AA	1	1	100.0	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.135	0	0.0	0.065	0	0.0	0.029	-
rs28929474	CC	7600	5058	66.0	1272	16.7	-	383	5.0	-	213	2.8	-	280	3.7	-	394	5.2	-	-
	CT	357	244	68.3	53	14.8	0.864	22	6.2	1.191	9	2.5	0.876	7	2.0	0.518	22	6.2	1.157	-
rs28929474	TT	6	5	83.3	1	16.7	0.795	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	0	0.0	0.001	-

^aSNP- single nucleotide polymorphism, ^bRR- relative risk. Asterisk denotes significant associations with p<0.05.

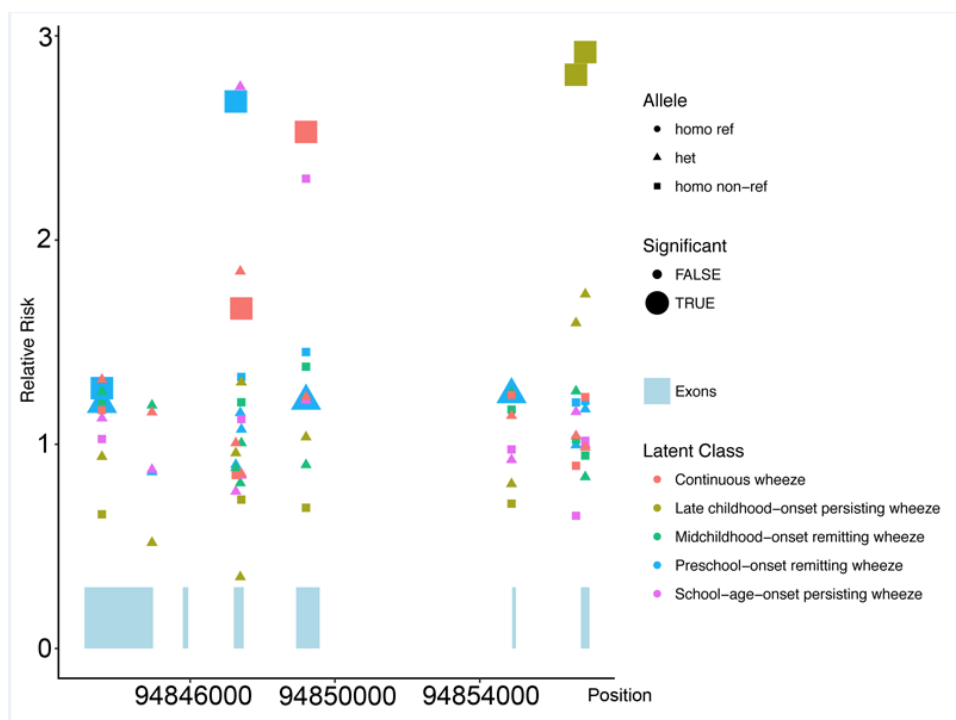


Figure 3. Distribution and relative risk of SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms among childhood wheezing phenotypes.

The relative risk for each wheezing phenotype is presented as a function of the genomic coordinates of each SNP on chromosome 14. Statistically significant SNP and relative risks (p -value < 0.05) are shown as large symbols, and small symbols for $p > 0.05$. Symbols indicate whether the genotype is homozygous PiMM (normal variant), heterozygous or homozygous mutated. SERPINA1 exons (E1-E5) are arranged from right to left, shown in light blue.

PresWeezAging LT cohort

Characteristics of the study and control groups

The median age of the children of the main Lithuanian group was 20.00 (11.00–31.50) months, male gender prevailed - 94 (64.8%) cases. In the control group, the average age of children was 53.50 (27.75–69.25) months. There is no significant difference between the sexes: 43 (58.1%) were boys and 31 (41.9%) were girls. Children with wheezing episodes were statistically

significantly younger than control children. The characteristics of the study participants are presented in Table 4.

Table 4. Age and gender of wheezing and control children included in the study.

Cases	Median Age (Months, IQR)	Range of Age		Male N (%)	Female N (%)
		Min	Max		
Main	20.00 (11.00–31.50)	2	66	94 (64.83)	51 (35.17)
Controls	53.50 (27.75–69.25)	3	72	43 (58.11)	31 (41.89)

N—number, IQR — interquartile range;

Of the 145 children diagnosed with wheezing, we found a normal PiMM genotype in 129 (88.97%), Pi*S – 3 (2.07%), and Pi*Z – 10 (6.90%) cases. Rare mutations (MPlowell) were also identified in 3 (2.07%) cases. Among children in the control group, the normal PiMM genotype was found in 68 (91.89%) children. No statistically significant difference was found between the prevalence of PiMM genotype in the main and control groups ($p = 0.496$). The distribution of alpha-1 antitrypsin genotypes in the main and control groups is presented in Tables 5.

Table 5. Distribution of alpha-1 antitrypsin genotypes in wheezing and control groups.

	Total N	PiMM N (%)	Pi*Z N (%)	Pi*S N (%)	Rare N (%)
Main group	145	129 (88.97)	10 (6.90)	3 (2.07)	3 (2.07)
Control group	74	68 (91.89)	3 (4.05)	3 (4.05)	0

Clinical characteristics of the main and control groups

Median AAT levels did not differ between the baseline and control groups: 144 (IQR 119.5–168) mg/dL in the wheezing group and 147.5 (IQR 126–165.25) mg/dL in the control group, $p = 0.701$. According to the questionnaire data, a total of 22.1% of wheezing children had clinically expressed food allergy and 26.9% had atopic dermatitis. The prevalence of food allergy and atopic dermatitis was significantly higher in wheezing children in the main group compared to the control group (Table 6). Family smoking was more prevalent in the families of children in the main group compared to the control group (33.79% vs. 6.76%, $p < 0.001$).

Table 6. Clinical characteristics of the main group and control group

Variable	Wheezing Group	Control Group	<i>p</i>
AAT concentration (IQR), mg/dL	144 (119.5–168)	147.5 (126–166.25)	0.701
Food allergy, N (%)	32 (22.07)	1 (1.35)	<0.001
Positive ODM or IgE, N (%)	37 (25.52)	3 (4.05)	<0.001
Allergic rhinitis	12 (8.27)	6 (8.11)	0.966
Atopic dermatitis, N (%)	39 (26.89)	2 (2.70)	<0.001
History of family smoking, N (%)	49 (33.79)	5 (6.76)	<0.001

When analyzing the questionnaire data, the subjects of the main group were divided into two groups: one group - children who applied to the medical institution for the first episode of wheezing in their life and the other - children who have already had an episode of wheezing. Of the 145 children in the main group clinically identified as having wheezing syndrome, 59 (40.69%) had a first wheezing episode and 86 (59.31%) presented for recurrent episodes. Children with a first episode of wheezing at study enrollment were significantly younger than those with recurrent episodes (15 (IQR 5–24) months and 25 (IQR 12.75–36) months of age, respectively, $p < 0.001$). Median AAT concentrations did not differ between children with a first episode of wheezing and children with recurrent episodes of wheezing. A significantly higher percentage of children with a first episode of wheezing required hospitalization compared to children with repeated episodes of wheezing (91.53% vs. 76.74%, $p = 0.021$), although the length of hospital stay did not differ. Other clinical characteristics, such as severity of wheezing, allergies, smoking in the family and the presence of comorbidities, did not differ significantly in these subgroups (Table 7).

Table 7. Clinical characteristics of children with the first and repeated wheezing episode.

Variable	Children with the First Wheezing Episode, N = 59	Children with Repeated Wheezing Episode, N = 86	<i>p</i>
Age (IQR), months	15 (5–24)	25 (12.75–36)	<0.001
AAT (IQR), mg/dl	148 (127–164)	139 (114.75–170)	0.431
Need of hospitalization, N (%)	54 (91.53)	66 (76.74)	0.021
Length of stay in hospital, days	3 (3–5)	4 (3–5)	0.957
Wheezing without getting cold, N (%)	2 (3.39)	23 (26.74)	<0.001

Variable	Children with the First Wheezing Episode, N = 59	Children with Repeated Wheezing Episode, N = 86	<i>p</i>
Mild wheezing, N (%)	13 (22.03)	30 (34.88)	0.215
Moderate wheezing, N (%)	28 (47.46)	37 (43.02)	
Severe wheezing, N (%)	18 (30.51)	19 (22.09)	
Food allergy, N (%)	11 (18.64)	21 (24.42)	0.410
Positive ODM/IgE, N (%) *	11 (68.75)	26 (52.00)	0.240
Allergic rhinitis, N (%)	3 (5.08)	9 (10.47)	0.361
Atopic dermatitis, N (%)	14 (23.73)	25 (29.07)	0.476
History of family smoking, N (%)	22 (37.29)	27 (31.40)	0.461
Concomitant diseases, N (%)	33 (55.93)	49 (56.98)	0.901

* N = 66 (others did not undergo allergy testing)

Also using questionnaire data, the subjects were divided into two groups by taking common cold as the main symptom. A common cold was diagnosed based on the anamnesis and objective data of the examination as well as the complaints expressed by the parents (fever, runny nose, cough). Objective examination data were evaluated according to the hospital-approved examination algorithm, and subjects with wheezing syndrome were divided into two groups: wheezing children when having a cold and wheezing children without having a cold. Out of 145 wheezing children, 25 (17.2%) experienced wheezing without having a cold. Children wheezing without a cold were significantly older than those who experienced wheezing only when they had a cold (30 months (IQR 13.5–52) vs. 19 months (IQR 10–30), $p = 0.009$). The median AAT concentration did not differ between wheezing children without having a cold and those wheezing only when they had a cold. A significantly higher percentage of wheezing children when having a cold needed hospitalization compared to children wheezing without a cold (88.33% vs. 56%, $p < 0.001$), but the length of stay in the hospital did not differ. There was no difference in wheezing severity between children wheezing with a cold and those wheezing without a cold. Allergic rhinitis, atopic dermatitis, and a family history of smoking were more frequent among children wheezing without a cold compared to those wheezing only when they had a cold (Table 8).

Table 8. Clinical characteristics of children wheezing without having a cold and children wheezing when having a cold.

Variable	Children with Wheezing without Having a Cold, N = 25	Children with Wheezing When Having a Cold, N = 120	<i>p</i>
Age (IQR), months	30 (13.5–52)	19 (10–30)	0.009
AAT (IQR), mg/dl	132 (105.5–151.5)	148 (123.25–169)	0.054
Need of hospitalization, N (%)	14 (56.00)	106 (88.33)	<0.001
Length of stay in hospital, days	4.5 (3–7.25)	3 (3–5)	0.063
Mild wheezing, N (%)	8 (32.00)	35 (29.17)	0.785
Moderate wheezing, N (%)	12 (48.00)	53 (44.17)	
Severe wheezing, N (%)	5 (20.00)	32 (26.67)	
Food allergy, N (%)	6 (24.00)	26 (21.67)	0.798
Positive ODM/IgE, N (%) *	7 (28.00)	30 (25.00)	0.054
Allergic rhinitis, N (%)	7 (28.00)	5 (4.17)	0.001
Atopic dermatitis, N (%)	11 (44.00)	28 (23.33)	0.034
History of family smoking, N (%)	14 (56.00)	35 (29.17)	0.010
Concomitant diseases, N (%)	12 (48.00)	70 (58.33)	0.343

* N = 66 (others did not undergo allergy testing)

During the objective examination, the wheezing severity of the children in the main group was evaluated using the PRAM rating scale (Appendix 4) and according to the scores, the wheezing severity could be: mild, moderate or severe. Among the wheezing children from the main group, 43 (29.66%) experienced mild wheezing, 65 (44.83%) experienced moderate wheezing, and 37 (25.52%) experienced severe wheezing. No statistically significant difference in AAT concentration and prevalence of AATD alleles was found between groups of patients categorized by disease severity (Table 9).

Table 9. Distribution of AAT alleles between wheezing children by disease severity.

Variable	Mild Wheezing	Moderate Wheezing	Severe Wheezing	<i>p</i>
AAT concentration (IQR), mg/dL	136 (100–167)	151 (126–185.5)	140 (121–158)	0.129
PiMM, N (%)	38 (29.46)	58 (44.96)	33 (25.58)	n.s.
Pi*S, N (%)	1 (33.33)	1 (33.33)	1 (33.33)	
Pi*Z, N (%)	3 (30.00)	4 (40.00)	3 (30.00)	
Rare, N (%)	1 (33.33)	2 (66.67)	0	
Total N (%)	43 (29.66)	65 (44.83)	37 (25.52)	-

n.s.—not significant.

Since AAT concentrations were determined in all subjects of the Lithuanian cohort, both children of the main wheezing group and children of the control group, we were able to compare the differences in concentrations between the groups and determine whether the main mutation-determining alleles affect AAT concentration. The median AAT concentration in PiMM wheezing children (n = 129) was 148.00 (IQR 124.5–170) mg/dL and in the control group (n = 68) was 149.5 (IQR 129.25–167.75) mg/dL.

The median AAT concentration in Pi*S wheezing children (n = 3) was 101 mg/dL and in the control group (n = 3) was 151 mg/dL.

The median AAT concentration in Pi*Z wheezing children (n = 10) was 95.3 (IQR 91.45–131.5) mg/dL and in the control group (n = 3) was 91.7 mg/dL. The median AAT concentration in wheezing children with rare mutations (n = 3) was 154 mg/dL.

The levels of AAT in wheezers and controls with deficient variants of AAT are shown in Figure 4.

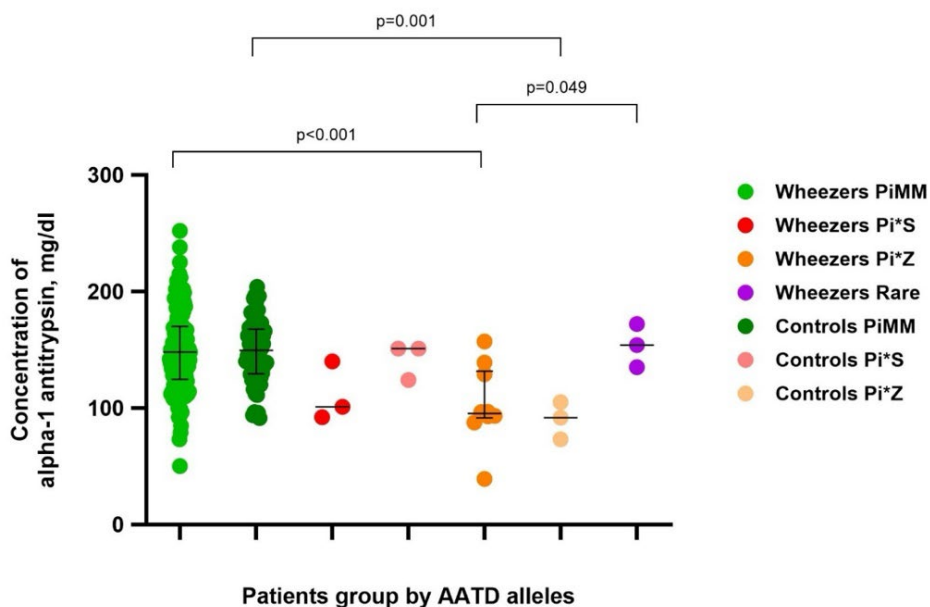


Figure 4. Plasma concentration of AAT in wheezers and controls in groups by genotype.

There was no statistically significant difference in AAT levels between main group with wheezing children and control groups by genotype.

The data we obtained confirmed the known fact that AAT concentration is lower in cases of deficient genotypes (Figure 4).

Pi*Z and Pi*S Frequencies in Comparison with Other Cohorts

For the comparison of Pi*Z and Pi*S allele frequencies, different groups of subjects from different cohorts were selected. The frequencies of Pi*Z and Pi*S alleles in our subjects per 1000 alleles were compared with the frequencies of Pi*Z and Pi*S alleles in patients with COPD from the Central–Eastern European AAT Network and with the frequencies of Pi*Z and Pi*S alleles in previous nonspecific epidemiological studies (NSES) conducted with Lithuanian residents. Allele frequencies were calculated using the same method. It was found that the Pi*Z allele is statistically significantly more common among wheezing children in Lithuania than among the subjects of non-specific epidemiological studies in Lithuania.

The frequency of Pi*S and Pi*Z alleles for 1000 alleles among wheezing children is close to the frequency of these alleles among COPD patients: Pi*S 10.3 (95% CI: 4.0–16.6) vs. 15.8 (95% CI: 6.92–24.6) and Pi*Z 44.8 (95% CI: 32.1–57.5) vs. 46.1 (95% CI: 31.1–60.9).

The Pi*Z allele in the wheezing group is significantly different from that of the control group (44.8 (95% CI: 32.1–57.5) vs. 20.27 (95% CI: 11.53–29.01). And on the contrary, more Pi*S mutational variants were found in the control group than in the wheezing group (20.27 (95% CI: 11.53–29.01) vs. 10.3 (95% CI: 4.0–16.6) (Table 10).

Table 10. Differences in Pi*Z and Pi*S allele frequencies among wheezing children, control group, COPD patients from the Central–Eastern European AAT Network, and Lithuanian nonspecific epidemiological studies (NSES).

Alleles	Alleles Frequencies for 1000 Alleles (95% CI)			
	Wheezing Group	Control Group	COPD Patients	Lithuanian NSES
Pi*Z	44.8 (95% CI: 32.1–57.5)	20.27 (95% CI: 11.53–29.01)	46.1 (95% CI: 31.1–60.9)	13.6 (95% CI: 10.7–17.4)
Pi*S	10.3 (95% CI: 4.0–16.6)	20.27 (95% CI: 11.53–29.01)	15.8 (95% CI: 6.92–24.6)	15.6 (95% CI: 12.5–19.6)

CI—95% confidence interval; NSES—Lithuanian nonspecific epidemiological studies, COPD—chronic obstructive pulmonary disease.

Probable frequency of alpha-1 antitrypsin deficiency genotypes

After evaluating the frequency of the most frequent pathological AAT alleles Pi*S and Pi*Z, the probable frequencies of the five most frequent AAT deficit-determining genotypes PiMZ, PiZZ, PiMS, PiSS, PiSZ in children with

wheezing syndrome were calculated according to the Hardy–Weinberg law (Table 11).

Table 11. The expected frequency of alpha-1 antitrypsin deficiency-determining genotypes in children with wheezing syndrome was calculated according to the Hardy-Weinberg law.

Alleles Frequencies		Probable frequency of genotypes (1/of)				
Pi*Z (95% PI)	Pi*S (95% PI)	MZ	ZZ	MS	SS	SZ
44.8 (95% PI:32.1–57.5)	10.3 (95% PI:4.0–16.6)	1/12	1/498	1/52	1/9344	1/1078

Since three mutational genotypes were identified in the study group of wheezing children: PiMZ, PiZZ and PiMS, comparing the frequencies of those three expected and determined AAT deficiency-determining genotypes in wheezing children, it was found that the determined frequency of the PiZZ genotype is significantly higher than expected ($\chi^2 = 24.3$, $p < 0.05$) (Table 12). No statistically significant difference was found between the observed and expected PiMZ and PiMS genotypes.

Table 12. Evaluation of concordance between expected and determined alpha-1 antitrypsin genotype counts in a major cohort of wheezing children.

Number of wheezing children with the corresponding AAT-deficiency genotype	PiMZ	PiZZ	PiMS
Seted (S) (n=145)	7	3	3
Probable (T) (n=145)	1/12	1/498	1/52
$\frac{(S-T)^2}{T}$	2,08	24,3	2,8
Pirsono χ^2 ,	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

CONCLUSIONS

1. Five of 10 SERPINA1 gene polymorphisms are associated with wheezing phenotypes in preschool children, respectively: rs11832, rs17580 (PiSS), rs709932 and rs1243160 with Preschool-onset remitting wheeze, and rs6647 and rs709932 with early-onset Continuous wheeze. Wheezing in children with the PiSS genotype, the risk of intermittent (recurrent) wheezing in preschool age is one of the highest and differs from the general population by more than 2.5 times.
2. SERPINA1 polymorphisms rs8004738 and rs17751769 are associated with Late childhood-onset persisting wheeze, and the same rs17751769 and rs709932 are associated with physician-diagnosed bronchial asthma in adolescence, but none of the 4 SERPINA1 polymorphisms associated with Preschool-onset remitting wheeze, not associated with school-age bronchial asthma.
3. The frequency of Pi*Z* and Pi*S alleles in the Lithuanian group of wheezing preschool children is 44.8 alleles per 1000 alleles (95% CI: 32.1–57.5) and 10.3 alleles per 1000 alleles (95% CI: 4.0–16.6), respectively, and is significantly higher compared to the frequency in the group of children without respiratory obstructive diseases and close to the frequency of these alleles in the group of adults with COPD. Rare mutations among wheezing preschool children account for 2.07%.
4. In preschool children with the alpha-1 antitrypsin Pi*Z allele and wheezing syndrome, alpha-1 antitrypsin concentration decreases significantly during an episode of acute airway obstruction, but the decrease in concentration at this age does not cause more severe respiratory dysfunction.
5. AAT genotype variants are important in the etiopathogenesis of both school-age bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In a heterogeneous cohort of wheezers, a COPD phenotype can be distinguished, which could be considered not only as a prognostic factor for COPD, but also as a clinical manifestation in early childhood of a disease previously diagnosed exclusively in adulthood.

PADĖKA

Esame labai dėkingi visai ALSPAC komandai, kurią sudaro apklausėjai, kompiuterių ir laboratorijų technikai, kanceliarijos darbuotojai, mokslininkai tyrėjai, savanoriai, vadybininkai, registраторiai ir slaugytojos. Pagrindinę paramą ALSPAC teikia Jungtinės Karalystės Medicininių tyrimų taryba ir „Wellcome“ (dotacija Nr. 102215/2/13/2) bei Bristolio universitetas.

Esame labai dėkingi visiems Lietuvos vaikams ir jų šeimoms bei medicinos personalui, dalyvavusiems lietuviškųjų grupių tyrime. Labai dėkojame pediatrams T. Alasevičiui, E. Vaitkaitienei, V. Lukošienei, R. Sabalienei, A. Storpirstienei, V. Misevičienei ir J. Šuliauskaitei, padėjusiems surinkti švokščiančių vaikų kraujo mėginius įvairiuose Lietuvos miestuose. Nuoširdžiai dėkojame S. Jančiauskienei iš Hanoverio medicinos mokyklos (Vokietija) Vokietijos plaučių tyrimų centro BREATH už metodologinę pagalbą ir kritinį įvertinimą bei redagavimą. Ypatinga padėka Nacionalinio tuberkuliozės ir plaučių ligų instituto Varšuvoje (Lenkija) komandai už pagalbą atliekant genetinę analizę.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos recenzuojamuose žurnaluose:

1. DeLuca*, David S.; Poluziorovienė, Edita; Taminskienė, Vaida; Wrenger, Sabine; Utkus, Algirdas; Valiulis, Algirdas; Alasevičius, Tomas; Henderson, John; Bush, Andrew; Welte, Tobias; Janciauskiene, Sabina; Valiulis, Arūnas. SERPINA1 gene polymorphisms in a population-based ALSPAC cohort // *Pediatric pulmonology*. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc. ISSN 8755-6863. eISSN 1099-0496. 2019, vol. 54, no. 9, p. 1474–1478. DOI: [10.1002/ppul.24422](https://doi.org/10.1002/ppul.24422). [DB: MEDLINE, Scopus, Science Citation Index Expanded (Web of Science)] [IF: 2.534; AIF: 3.166; Q2 (2019 InCities JCR SCIE)].
*David S. DeLuca and Edita Poluzioroviene contributed equally to this work.
2. Poluziorovienė, Edita; Chorostowska-Wynimko, Joanna; Petraitienė, Sigita; Strumila, Arūnas; Rozy, Adriana; Zdral, Aneta; Valiulis, Arūnas. Prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency alleles in a Lithuanian cohort of wheezing small children // *Advances in respiratory medicine*. Basel : MDPI. ISSN 2451-4934. eISSN 2543-6031. 2024, vol. 92, iss. 4, p. 291–299. DOI: [10.3390/arm92040028](https://doi.org/10.3390/arm92040028). [DB: Emerging Sources Citation Index (Web of Science)] [IF: 2.1; Q3 (2023 InCities JCR SCIE)].

Publikacijos kituose žurnaluose:

1. Valiulis, Arūnas; Juškieienė, Izabelė; Poluziorovienė, Edita; Valiulis, Algirdas. ERS Guidelines of preschool wheezing and beyond: phenotypic approach for daily practice // 6th International conference on lung health, 5–8 November 2019, Bangladesh : scientific proceedings. Bangladesh : Bangladesh Lung Foundation. 2019, p. 49.
2. Bush, Andrew; Ferkol, Thomas; Valiulis, Algirdas; Mazur, Artur; Chkhaidze, Ivane; Maglakelidze, Tamaz; Sargsyan, Sergey; Boyajyan, Gevorg; Cirstea, Olga; Doan, Svitlana; Katilov, Oleksandr; Pokhylko, Valeriy; Dubey, Leonid; Poluziorovienė, Edita; Prokopčiuk, Nina; Taminskienė, Vaida; Valiulis, Arūnas. Unfriendly fire: how the tobacco industry is destroying the future of our children = Nedraugiška ugnis: kaip tabako pramonė griauja mūsų vaikų ateitį // *Acta medica Lituanica*. Vilnius : Vilniaus universiteto

- leidykla. ISSN 1392-0138. eISSN 2029-4174. 2021, vol. 28, no. 1, p. 6–18. DOI: [10.15388/Amed.2020.28.1.6](https://doi.org/10.15388/Amed.2020.28.1.6). [DB: Scopus, Dimensions, MEDLINE, Index Copernicus, Scilit].
3. Juškienė, Izabelė; Prokopčiuk, Nina; Franck, Ulrich; Valiulis, Algirdas; Valskys, Vaidotas; Meščeriakova, Vitalija; Kvedarienė, Violeta; Valiulytė, Indrė; Poluziorovienė, Edita; Šaulienė, Ingrida; Valiulis, Arūnas. Indoor air pollution effects on pediatric asthma are submicron aerosol particle-dependent // *European journal of pediatrics*. New York : Springer. ISSN 0340-6199. eISSN 1432-1076. 2022, vol. 181, iss. 6, p. 2469–2480. DOI: [10.1007/s00431-022-04443-6](https://doi.org/10.1007/s00431-022-04443-6). [DB: Science Citation Index Expanded (Web of Science), Scopus, MEDLINE] [IF: 3.600; AIF: 3.000; Q1 (2022 InCities JCR SCIE)].
 4. Poluziorovienė, Edita; Vaitkaitienė, Eglė; Petraitienė, Sigita; Lukošienė, Vilma; Valiulis, Algirdas; Rudzevičienė, Odilija; Leišys, Ramūnas; Valiulis, Arūnas. Can SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms serve as a predictor of school-age asthma in a cohort of wheezing children? // *5th Baltic Paediatric Congress & 23rd Estonian Paediatric Association Congress*, 2–4 June 2022, Tallinn, Estonia : programme and abstract book. Tallinn. 2022, p. 50–51.
 5. Poluziorovienė, Edita; Chorostowska-Wynimko, Joanna; Strumila, Arūnas; Valiulis, Arūnas. Epidemiological situation of ALPHA-1 antitrypsin PiS and PiZ variants and their clinical significance in a cohort of lithuanian preschool wheezers // *EAP 2023: European Academy of Paediatrics 2023 Congress and Mastercourse : abstract book*. Lausanne : Frontiers Media SA, 2023. ISBN 9782832512364. p. 105–106. Prieiga per internetą: <https://doi.org/10.3389/978-2-8325-1236-4>.

Pranešimai tarptautinėse konferencijose:

1. „Can SERPINA1 gene polymorphisms connect wheezing phenotypes and school age asthma?“, International Conference „Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM 2019)“, Florencija, Italija, 2019.
2. “SERPINA1 gene polymorphisms and the risk of developing wheezing/school age asthma“, aštuntasis Europos pediatrių draugijų akademijos virtualus kongresas (EAPS) 2020.

3. „Can SERPINA1 gene polymorphisms be associated with the risk of developing wheezing/school age asthma?“, tarptautinis kongresas „World Summit on Pediatrics 2021“ Lisabona, Portugalija, 2021.
4. „First lessons of Lithuanian AATD wheezing children cohort“. 31-oji Vilniaus tarptautinė vaikų pulmonologijos ir alergologijos konferencija mokykla, Vilnius, 2021.
5. „Wheezing and other clinical masks of alfa-1 antitrypsin deficiency“. Poltavos universiteto 100-ojo jubiliejaus konferencija, Poltava, Ukraina, 2021.
6. „Can SERPINA1 gene single nucleotide polymorphisms serve as a predictor of school-age asthma in a cohort of wheezing children?“. 5th Baltic Paediatric Congress, Talinas, Estija, 2022.
7. „The incidence of severe alpha-1 antitrypsin deficiency alleles in Lithuanian cohort of wheezing children“. 22nd Congress of the European Anthropological Association, Vilnius, 2022.
8. „Incidence of alpha-1 antitrypsin Pi*S and Pi*Z alleles in Lithuanian cohort of wheezing children“. The 9th Congress of the European Academy of Paediatric Societies, Barselona, Ispanija, 2022 (stendinis pranešimas).
9. „Wheezing, barking cough and other signs of acute obstructive syndrome require urgent help. How can we help?“, The Course of Paediatric Emergency Care, Poltava, Ukraina, 2023.
10. „Epidemiological situation of Alpha-1 antitrypsin PiS and PiZ variants and their clinical significance in a cohort of Lithuanian preschool wheezers“, European Academy of Paediatrics Congress & MasterCourse, Paduja, Italija, 2023.
11. „Preschool wheeze, COPD, and alpha-1 antitrypsin: Lithuanian cohort data“. 1st International conference of young researchers of the Georgian Respiratory Association in Batumi, Batumis, Gruzija, 2023.

Pranešimai nacionalinėse konferencijose:

1. „Alfa-1 antitripsino deficitas ir lėtinės plaučių ligos: kas naujo?“, Respublikinė konferencija „Pulmonologijos ir alergologijos ruduo 2019“, Klaipėda, 2019.
2. „SERPINA1 variantai, kūdikių švokštimo sindromas ir lėtinės suaugusiųjų plaučių ligos“, Respublikinė konferencija „Vaikų sveikatos priežiūra 2019“, Vilnius, 2019.

3. „alfa-1 antitripsino deficito klinikinės kaukės: kada įtarti, kur tirti ir dispanserizuoti?“, IV Respublikinėje nuotolinėje konferencijoje „Vaikų sveikatos priežiūra 2021“, Vilnius, 2021.
4. „Vaikų švokštimo sindromas – ką sako mokslas ir naujausios rekomendacijos gydytojams?“ XVIII Pasaulinei lėtinės obstrukcinės plaučių ligos dienai skirta nuotolinė konferencija „Pulmonologijos ir alergologijos ruduo 2022“, Klaipėda, 2022.
5. „Bronchų astmos ilgalaikė priežiūra – kas naujo?“ XVIII Respublikinė nuotolinė konferencija, skirta pasaulinei Vaikų gynimo dienai, Vilnius, 2024.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 25 egz.