

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL PNEUMOLOGIE



DEFICITUL DE ALFA-1 ANTITRIPSINĂ CA EXPRESIE FENOTIPICĂ ÎN BPOC

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

PROF. DR. FLORIN DUMITRU MIHĂLȚAN

STUDENT - DOCTORAND:

DR. NEBUNOIU (ZAHARIE) ANA-MARIA

2018

CUPRINS

LISTĂ LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	4
LISTĂ ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT.....	8
INTRODUCERE.....	10
PARTEA GENERALĂ.....	15
1. Epidemiologie.....	16
2. De la defectul genetic la biologia moleculară.....	18
3. Manifestări.....	23
3.1. Deficitul de alfa-1 antitripsină în patologia pulmonară.....	23
3.1.1. Date generale.....	23
3.1.2. Investigații folosite pentru evidențierea și monitorizarea afectării pulmonare.....	25
3.1.3. Principalele tipuri de manifestări pulmonare.....	30
3.1.3.1. BPOC-ul în DAAT.....	30
3.1.3.1.1. Generalități.....	30
3.1.3.1.2. Mecanisme inflamatorii.....	33
3.1.3.1.3. Exacerbări.....	36
3.1.3.2. Astmul în DAAT.....	37
3.1.3.3. Bronșiectaziile în DAAT.....	38
3.1.3.4. Pneumotoraxul spontan în DAAT.....	38
3.1.4. Tratamentul afecțiunilor pulmonare asociate DAAT.....	39
3.1.4.1. Tratamentul medical.....	39
3.1.4.2. Tratamentul chirurgical.....	39
3.1.4.3. Terapia de augmentare.....	39
3.1.4.4. Transplantul pulmonar și hepatic.....	43
3.1.4.5. Interferențe genetice.....	44
3.2. Deficitul de alfa-1 antitripsină în patologia hepatică.....	45
3.3. Deficitul de alfa-1 antitripsină în alte boli.....	47
3.3.1. Paniculita necrotizantă ca manifestare a DAAT.....	47
3.3.2. Alte boli asociate cu DAAT.....	48
3.4. Prognosticul pacientului cu DAAT.....	48
4. Detecția DAAT.....	50
CONTRIBUȚIE PERSONALĂ.....	53

5.	Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	54
6.	Metodologia generală a cercetării.....	55
7.	Screening-ul pentru deficitul de alfa-1 antitripsină.....	58
7.1.	Introducere.....	58
7.2.	Metodologie.....	58
7.3.	Rezultate.....	61
7.3.1.	Analiza descriptivă a datelor.....	61
7.3.2.	Estimarea prevalenței.....	67
7.3.3.	Testarea ipotezelor.....	69
7.3.3.1.	Ipoteza 1: Simptome specifice.....	69
7.3.3.2.	Ipoteza 2: Valori mai scăzute ale AAT și specifice fiecărui genotip.....	71
7.3.3.3.	Ipoteza 3: Severitate și frecvență diferite ale BPOC în funcție de genotip.....	72
7.3.3.4.	Ipoteza 4: Cea mai eficientă indicație de testare.....	73
7.4.	Discuții.....	74
7.5.	Concluzii.....	81
8.	Analiza comparativă în cadrul pacienților cu BPOC, cu sau fără DAAT.....	87
8.1.	Introducere.....	87
8.2.	Metodologie.....	88
8.3.	Rezultate.....	89
8.3.1.	Ipoteza 1: Debut mai precoce al bolii la pacienții cu deficit de alfa-1 antitripsină.....	89
8.3.2.	Ipoteza 2: Asociere mai frecventă a emfizemului și a astmului bronșic în cazul pacienților cu DAAT.....	98
8.3.3.	Ipoteza 3: Severitate mai mare a bolii la pacientul cu DAAT.....	104
8.3.4.	Ipoteza 4: Fără diferențe privind istoricul și cuantumul tabagic.....	114
8.4.	Discuții.....	119
8.5.	Concluzii.....	123
9.	Analiza pacienților identificați cu DAAT.....	124
9.1.	Introducere.....	124
9.2.	Metodologie.....	124
9.3.	Rezultate.....	125
9.3.1.	Descrierea pacienților.....	125

9.3.2.	Testarea ipotezelor.....	130
9.3.2.1.	Ipoteza 1: Analiza posibilelor interrelații între severitatea bolii obstructive pulmonare și particularități clinice.....	130
9.3.2.2.	Ipoteza 2: Factori de prognostic în BPOC-ul sever.....	133
9.4.	Discuții.....	133
9.4.1.	Discuții generale.....	133
9.4.2.	Studii de caz.....	136
9.5.	Concluzii.....	139
10.	Concluzii și contribuții personale.....	141
10.1.	Concluzii.....	141
10.2.	Contribuții personale.....	142
BIBLIOGRAFIE.....		146
ANEXA 1 – ARTICOLE PUBLICATE.....		163

LISTĂ ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT

AAT	Alfa-1 antitripsină
ANCA	Anticorpi anticitoplasmaneutrofilică
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BPOC	Bronhopneumopatia obstructivă cronică
C-ANCA	Anticorpi anticitoplasmaneutrofilică de tip citoplasmatici
CT	Tomografie computerizată
CVF	Capacitate vitală forțată
DAAT	Deficit de alfa-1 antitripsină
DBS	<i>Drybloodspots</i>
DS	Deviație standard
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FA	Frecvența absolută
FR	Frecvența relativă
GOLD	<i>Global Obstructive Lung Disease</i>
IQR	<i>Inter Quartile Range</i>
KCO	Constanta de transfer
OR	<i>Oddsratio</i>
PA	Index pachete-an
RV	Volum rezidual
TLC	Capacitate pulmonară totală
VEMS	Volumul expirator maxim pe secundă

PARTEA GENERALĂ

Introducere

Deficitul de alfa-1 antitripsină (DAAT) este o boală genetică cu transmitere autosomal dominantă ce are tot ce este necesar pentru ca un program de *screening* să fie funcțional: impact semnificativ pe statusul de sănătate, modalitate facilă de identificare, prevenție disponibilă (fumatul și expunerea ambientală sau profesională la noxele respiratorii au un impact uriaș asupra pacientului cu DAAT), și tratament disponibil (chiar dacă nu pentru toți și nu în orice condiții). Și totuși, DAAT continuă să fie subdiagnosticat, la nivel global, și mai ales în România.

1. Epidemiologie

Deficitul de alfa-1 antitripsină (DAAT) este o patologie rară (având o incidență a formei severe de 5/1500 [1]) ce are la bază mai multe modificări genetice [2] ale unei gene denumite SERPINA 1, de pe cromozomul 14 [3]. Deși descrisă ca și entitate clinică în anii 60 [4,5], încă nu se bucură de o recunoaștere (și de o cunoaștere) la scară largă între specialiști, fiind subdiagnosticată (o estimare aproximativă, globală a proporției de pacienți diagnosticați din totalul estimat se situează între valorile de 5-10% [6,7]). Frecvența diferitelor alele implicate în patogenia DAAT variază la nivel global, iar frecvența alelelor celor mai frecvente este cuprinsă în hărți de frecvență [8–10], ce pornesc de la estimarea cazurilor raportate, având în vedere legile bolilor rare (echilibrul Hardy-Weinberg).

România se află într-o zonă de frecvență scăzută a DAAT, atât în ceea ce privește alela Z, cât și alela S, principalele alele identificate în DAAT [11].

2. De la defectul genetic la biologia moleculară

Ca urmare a modificărilor genetice au loc tulburări în sinteza, excreția și funcția unei proteine plasmatice denumite alfa-1 antitripsină (AAT), principala antiprotează serică [5,12,13]. Ca urmare a acestei dereglări primele modificări ce pot apărea sunt cele la nivel hepatic (locul de sinteză al AAT, unde AAT ce nu se poate excreta [14] se acumulează intracitoplasmatic[15] și este responsabilă de apariția patologiei). Modificările apar la copil sub forma hepatitei neonatale, icterului prelungit [16,17], cirozei hepatice (DAAT fiind principala cauză de transplant hepatic la copil [18]), iar la adult [19] ca fibroză, ciroză hepatică, carcinom hepato-celular [20].

Adevăratul rol al AAT se manifestă însă la nivel pulmonar, unde se opune excesului proteazic reprezentat în primul rând de elastaza neutrofilică [21]. În absența unei cantități

suficiente de AAT rezultă un exces proteazic responsabil în timp (mai ales la fumători) de afectarea propriului țesut [22]. Afectarea pulmonară s-a dovedit a fi corelată cu valoarea plasmatică a AAT și cu tipul de proteină implicată [23].

3. Manifestări

Deși modificările pulmonare pot apărea din copilărie, sub forma unui astm greu de controlat [24], ele sunt rareori legate de riscul de DAAT, și cel mai frecvent boala se diagnostichează după vârsta de 30-40 ani (de obicei cu o întârziere semnificativă și consultarea mai multor specialiști [25,26]) și se manifestă prin bronho-pneumopatie obstructivă cronică (BPOC), emfizem, bronșiectazii, care în mod particular față de pacientul fără DAAT sunt mai severe, apar mai precoce, inclusiv la pacienții nefumători, au o evoluție mai accelerată [27–29]. Astfel, recomandarea ghidurilor actuale de management al DAAT este de a testa pentru DAAT cel puțin o dată în viață (dintre pacienții respiratori) toți pacienții cu BPOC, astm cu obstrucție incomplet reversibilă, pe cei cu emfizem, bronșiectazii fără o cauză aparentă [30–32].

În ceea ce privește evaluarea în timp a progresiei bolii, se recomandă a se evalua pacientul periodic (în principiu anual) atât din punct de vedere clinic, cât și paraclinic, cu accent deosebit de spirometrie, pletismografie și declinul principalilor parametri urmăriți-volumul expirator maxim pe secundă (VEMS) și constanta de transfer alveolo-capilar (KCO). Pe de altă parte, studiile ultimilor ani dovedesc sensibilitatea sporită pe care o are în acest scop densitometria pulmonară, încă neintrată în uz în afara studiilor clinice [33,34].

Tratamentul DAAT are la bază compensarea deficitului plasmatic cu administrarea intravenoasă de AAT umană purificată [30]. Terapia, denumită terapie de augmentare, a avut dificultăți în dovedirea eficienței, în primul rând datorită numărului scăzut de pacienți ce participă la studiile clinice (DAAT fiind o boală rară), în al doilea rând datorită metodelor folosite pentru testarea eficienței (multă vreme s-a încercat evidențierea diferențelor în ceea ce privește declinul VEMS-ului [35], recent însă s-a dovedit că mult mai eficientă ar fi urmărirea densitometrică a emfizemului [36,37]).

4. Detecția DAAT

Dacă la nivel global situația în ceea ce privește detecția DAAT nu este tocmai fericită, în România până în anul 2012 nu a existat nici o aplecare asupra acestui subiect. Abia atunci România a participat la un studiu european de prevalență, ale cărui rezultate s-au publicat în 2017 [38]. În afară de acest studiu, singura modalitate de testare pentru DAAT a fost testarea valorii plasmatică a AAT, metodă insuficientă și failibilă [39], care se recomandă conform

ghidurilor curente [34] a se completa cu fenotipare, genotipare, eventual și de secvențiere genică într-un laborator de referință. Tratamentul pentru DAAT este total inaccesibil pacienților români în acest moment.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Având în vedere sărăcia informațiilor în ceea ce privește DAAT în România, prima modalitate de adresare a acestui studiu a fost aceea ce a testa un număr cât mai mare de pacienți la risc, prin testare specializată în laborator de referință european (Laboratorul Central de Referință pentru Rețeaua Central-Est Europeană de DAAT din Varșovia), urmând ca apoi să raportăm aceste rezultate sub formă de prevalență în populația la risc (prin estimarea, folosind legile Hardy-Weinberg). Ca obiective secundare ale acestui prim obiectiv primar au fost: compararea pacienților cu deficit versus cei fără deficit (privind patologii asociate, simptome) pentru a stabili posibili modalități de eficientizare a programului de detecție a DAAT, evaluarea valorii medii a AAT în funcție de fiecare genotip, în încercarea de a folosi valoarea plasmatică pentru estimarea genotipului, evidențierea eficienței programului de testare prin identificarea bolilor (indicațiilor de testare) în care prevalența DAAT s-a dovedit maximă.

Un al doilea obiectiv (evaluat într-un al doilea substudiu) a fost cel de a compara pacienții cu BPOC identificați cu DAAT versus grupul pacienților testați pentru DAAT, dar infirmați, cu scopul de a evidenția particularități ale BPOC asociat DAAT, precum vârstă de debut mai mică, severitate mai mare a cazurilor, asociere diferită de patologii pulmonare, o valoare semnificativ mai scăzută a valorii plasmatice a AAT.

Al treilea obiectiv a fost acela de a caracteriza pacienții identificați cu DAAT pentru a surprinde particularități ale patologiei pulmonare a acestora, precum și a analiza diferite corelații și a identifica factori de risc pentru prognostic negativ.

6. Metodologia generală a cercetării

Pentru primul obiectiv au fost testați pacienții cu indicație de testare conform recomandărilor ATS/ERS [30]: Adult simptomatic cu emfizem, BPOC, astm cu obstrucție bronșică incomplet reversibilă, boală hepatică neexplicată, indivizi asimptomatici cu obstrucție persistentă pe spirometrie și cu factori de risc identificabili, paniculita necrotizantă, bronșiectazii fără o etiologie evidentă, adolescenți cu obstrucție bronșică persistentă, indivizi

asimptomatici cu obstrucție bronșică persistentă și fără factori de risc, adulți cu vasculită C-ANCA pozitivă, frate al unui pacient cu DAAT, la care am adăugat de asemenea: pneumotorax spontan, bronșită cronică, după excluderea oricăror alte etiologii. Pacienții au fost selectați dintre pacienții ce fie au fost internați fie s-au prezentat pentru consult în Institutul Marius Nasta, București, iar medicul curant a considerat oportună și indicată testarea pentru DAAT.

O dată identificați pacienții pentru testare, aceștia au fost evaluați (în baza documentelor medicale existente), informați de scopul testării, consiliați pretestare. După informarea pacientului (sau al tutorelui legal, în cazul copiilor) s-a obținut consimțământ informat atât în ceea ce privește testarea genetică, cât și în ceea ce privește prelucrarea datelor pacientului. Din documentele medicale ale pacientului s-au reținut cele demografice, cele referitoare la indicația de testare, istoric de fumat, rezultate spirometrice, alte diagnostice cunoscute. S-au reținut de asemenea date de contact pentru contactarea ulterioară a pacienților.

Testarea s-a făcut prin recoltare de sânge venos, ce ulterior a fost impregnat pe hârtii de filtru speciale, folosite pentru diagnosticul DAAT [40] (DBS) și trimis către laboratorul din Varșovia, unde a fost testat conform protocolului și a expertizei locale [41].

Analiza pentru primele două părți ale prezentei cercetări s-a efectuat în baza acestor date.

Pacienții cu orice fel de modificare genetică au fost contactați ulterior și invitați să se prezinte la Institut pentru evaluare detaliată. În cazul în care aceștia s-au încadrat criteriilor de includere și au fost de acord cu semnarea unui nou formular de consimțământ informat, au intrat în partea a treia a cercetării.

La luarea în evidență s-au explicat pe larg date despre DAAT și conexiunea cu boala pe care pacientul o are, s-a semnat formular de consimțământ privind investigațiile la care pacientul va fi supus (pletismografie și măsurarea transferului gazos, gazometrie arterială dacă pacientul are indicație, CT toracic), precum și întrebările ce i se vor adresa în cadrul evaluării.

Datele din toate cele trei substudii au fost introduse într-o bază de date Apache OpenOfficedatabase © 2014 The Apache Software Foundation, iar analiza statistică a fost făcută cu ajutorul programelor SAS University Edition, (c) SAS Institute Inc. 100 SAS Campus Drive Cary, NC 27513-2414, USA și R versiunile 3.4.4 (2018-03-15) și R 3.4.4 (“Someone to Lean On”) - Copyright (C) 2018 The R Foundation for Statistical Computing Platform R Core Team (2018). R A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

Pentru descrierea lotului de studiu, datele sunt prezentate sub forma frecvențelor absolute / frecvențelor relative pentru variabilele categoricale, respectiv sub forma medie aritmetică ($\pm$ Deviație Standard) sau mediană (Inter Quartile Range) pentru variabilele continue. Grafic au fost folosite *dotchart*-uri sau *barplot*-uri, în vreme ce la analiza statistică inferențială s-au folosit teste bidirecționale pentru egalitatea de proporții (χ^2 / Fisher Exact în funcție de situație).

Pentru variabilele continue, la analiza descriptivă s-a determinat tendința centrală a distribuției (măsurată cu ajutorul mediei aritmetice și a medianei), tendința la variabilitate (măsurată cu ajutorul deviației standard și IQR = *Inter Quartile Range*, diferența între quartila de 75 și cea de 25), simetria distribuției (măsurată cu ajutorul *skewness*-ului), minimul și maximul distribuției alături de intervalul distribuției (*range*), iar grafic s-au utilizat histograme, ploturi de probabilitate normală și pentru comparații *boxplot*-uri și *stripchart*-uri. La analiza statistică inferențială s-au folosit teste Welch t sau procedee de reeșantionare (*bootstrap*), în funcție de situație (în funcție de cât de apropiată a fost distribuția variabilei de distribuția normală). Wilcoxon Rank Sum Test, Two-sample χ^2 test twosided este alternativa Welch și *bootstrap* pentru comparația variabilelor continue.

Regresia logistică s-a folosit pentru decelarea factorilor care influențează *outcome*-ul reprezentat de o variabilă binară.

Pentru testarea corelațiilor s-a folosit testul neparametric Spearman de corelație a rangurilor.

O valoare a $p < 0.05$ a fost considerată cu semnificație statistică.

7. Screening-ul pentru deficitul de alfa-1 antitripsină

Un număr de 758 pacienți la risc (conform criteriilor redată mai sus) au fost testați pentru DAAT în perioada octombrie 2012-octombrie 2017. Vârsta medie a pacienților testați a fost de 49.73 (± 16.53) ani, cu o predominanță masculină (58.96%). Mai mult de jumătate din pacienți erau fumători activi la momentul testării (52.96%), o altă proporție importantă (37.53%) au fost exfumători (cu un quantum tabagic mediu pentru cele două categorii de 25 PA).

Dintre indicațiile pneumologice de testare, principala indicație de testare pentru DAAT a fost reprezentată de BPOC (47.76%), urmată de bronșiectazii, emfizem pulmonar, astm bronșic, pneumotorax. Un procent de 1.05% dintre pacienți au asociat alte patologii indicate de ghid (diferite de cele pneumologice) pentru testarea pentru DAAT: hepatită cronică, vasculită C-ANCA pozitivă, paniculită necrotizantă. De asemenea, un procent de 1.82%

dintre pacienți au fost testați fiind rude ale unor pacienți purtători ai unui genotip modificat pentru DAAT.

Dispneea de efort a fost principalul simptom descris de pacienți, în 79.74% din cazuri, urmat îndeaproape de tusea cronică, 70.62% din cazuri.

Mediana alfa-1 antitripsinei a fost de 134.56 (IQR 48.00) mg/dl, valoare ce se încadrează în limitele normale ale laboratorului.

Testarea a permis pe de-o parte aprecierea frecvențelor principalelor genotipuri identificate (92.2% MM, 3.3% MS, 2.4% MZ, 1.1% MRar, 0.7% ZZ, 0.3% ZRar, 0.1% SZ), pe de altă parte estimarea prevalențelor alelelor și a genotipurilor folosind echilibrul Hardy-Weinberg (tabelele 7.8, 7.9).

Tabelul 7.8: Proporția genotipurilor la nivelul populației reprezentative

Genotip	Proporția la Populație [IC95%]
MM	0.91355 [0.89354 la 0.93355]
MZ	0.03899 [0.02520 la 0.05277]
MS	0.03268 [0.02002 la 0.04533]
MRară	0.01242 [0.00453 la 0.02030]
ZZ	0.00041 [0.00001 la 0.00185]
SZ	0.00069 [0.00001 la 0.00255]
ZRară	0.00026 [0.00001 la 0.00140]
SS	0.00029 [0.00001 la 0.00150]
SRară	0.00022 [0.00001 la 0.00127]
RarăRară	0.00004 [0.00001 la 0.00049]

Tabelul 7.9: Proporția genotipurilor la nivelul populației reprezentative (1 / Hardy-Weinberg)

Genotip	Prevalenta 1 / Hardy-Weinberg
MM	1 / 1.09
MZ	1 / 25
MS	1 / 30
MRară	1 / 80
ZZ	1 / 2439
SZ	1 / 1449

ZRară	1 / 3486
SS	1 / 3448
SRară	1 / 4545
RarăRară	1 / 25000

După estimarea prevalențelor s-au testat ipotezele de studiu și s-au obținut următoarele rezultate:

- Ipoteza 1: Simptome specifice: ne-am propus compararea pacienților cu deficit confirmat și fără deficit confirmat în ceea ce privește motivul testării și simptomele în tentativa de a identifica un simptom specific sau o particularitate a testării în România privind indicațiile de testare. Rezultatele au dovedit o frecvență mai scăzută a bronșiectaziilor în rândul pacienților cu DAAT dovedit (25.42 vs 39.05%, $p=0.038$), trădând probabil o prea mare importanță acordată acestui diagnostic de testare și de asemenea o frecvență mai crescută a wheezingului (40.67 vs 27.89, $p=0.037$) și a tusei cronice (83.05 vs 70.18, $p=0.033$) la pacienții cu DAAT.
- Ipoteza 2: Valori mai scăzute ale AAT și specifice fiecărui genotip: ne-am propus să dovedim valori ale AAT diferite între pacienții cu, respectiv fără genotip anormal; de asemenea valori diferite ale AAT pentru fiecare genotip în parte – posibilitatea de a prezice genotipul în funcție de valoarea plasmatică. S-a dovedit într-adevăr, diferență semnificativă statistic între pacienții cu și fără DAAT în ceea ce privește valoarea plasmatică a DAAT (102 vs 138 mg/dl, $p<0.001$), de asemenea, valori semnificativ diferite între fiecare dintre subgrupurile genetice ($p<0.0001$). Totuși, valoarea plasmatică nu poate prezice genotipul decât în afectarea severă, în modificările heterozigote valoarea plasmatică fiind normală.
- Ipoteza 3: Severitate și frecvență diferite ale BPOC în funcție de genotip: pentru aceasta am încercat să dovedim că există valori diferite ale VEMS-ului, precum și frecvență diferită a BPOC-ului la fiecare genotip în parte. Atunci când s-a analizat per ansamblu cohorta testată (cu pacienți cu și fără BPOC), s-au dovedit diferențe semnificative în ceea ce privește proporția de pacienți din fiecare subtip genetic în parte, proporția de bărbați, precum și un p marginal

ne semnificativ privind valoarea VEMS corespunzătoare fiecărui genotip în parte. Analiza separată, doar a pacienților cu BPOC a dovedit că valorile VEMS-ului sunt diferite între genotipuri, variind între 26% pentru genotipul SZ și 56.5% pentru genotipul ZZ. Numărul mic de pacienți nu a permis însă o analiză statistică corespunzătoare și rezultatele trebuie privite cu prudență.

- Ipoteza 4: Cea mai eficientă indicație de testare: ne-am propus să identificăm indicația cea mai eficientă pentru testare (în sensul unei prevalențe maxime a genotipurilor DAAT pentru indicația respectivă). În mod paradoxal, prevalența DAAT este maximă în grupurile fie fără indicație pneumologică de testare, fie în grupurile fără o indicație de testare statuată în ghiduri (de exemplu pneumotoraxul spontan). Având în vedere faptul că designul studiului nu a pornit cu acest obiectiv, comparația între categoriile de indicații nu este posibilă.

Discuții

Un procent de 7.79% din pacienții testați au avut un genotip modificat. Această proporție este comparabilă cu a altor populații la risc [42], dar foarte mică, comparativ cu studii ale unor țări cu tradiție în testarea pentru DAAT [43,44]. În urma prezentului studiu au putut fi estimate, pentru prima dată într-o populație românească (cohorta pacienților la risc de DAAT) prevalențele diferitelor genotipuri în România prin estimarea acestora presupunând legile Hardy-Weinberg.

Un număr de 10 pacienți (1.32%) au prezentat un genotip rar, dintre aceștia 2 (0.26%) au avut un genotip de tip ZRar, deci cu un deficit sever de AAT. Sunt procente mici, comparativ cu cele ale Italiei, cunoscută fiind implicarea acestei țări în identificarea genotipurilor rare [45], însă mai mare decât ne-am fi așteptat. La fel de interesant este de observat faptul că din țările implicate în proiectul european citat anterior, publicat în 2017, România a fost singura țară ce a identificat genotip de tip ZRar [38]. O concluzie de tras de aici este aceea că o atenție deosebită trebuie acordată genotipurilor rare, în special la pacienții care nu se încadrează în tiparele clasice.

Diferențele privind prevalența fiecărei boli în rândul pacienților cu, respectiv fără modificare genetică au relevat următoarele: nu există diferențe clinice și statistice ($p > 0.05$) semnificative în ceea ce privește diagnosticul emfizemului, astmului bronșic, BPOC-ului, pneumotoraxului, aceasta deși pentru toate categoriile frecvența respectivelor diagnostice este aparent mai scăzută în grupul celor cu modificări genetice versus grupul fără modificări. De asemenea, nu există semnificație statistică nici în ceea ce privește stadiul BPOC în care se află

pacienții din cele 2 loturi. Diferența atinge semnificația statistică (și epidemiologică) în cazul bronșiectaziilor (25 vs. 39%, $p=0.038$) și ar putea semnifica o exagerare a testării acestei indicații (din moment ce proporția de pacienți cu bronșiectazii este mai mică în cazul celor cu deficit decât în cazul celor fără deficit, acest rezultat ar putea însemna o eficiență scăzută a testării pentru această indicație). Nu trebuie uitat faptul că România este o țară endemică pentru tuberculoză, și chiar în absența unui diagnostic antecedent cunoscut de tuberculoză, bronșiectaziile pot fi urmarea acestei boli. Rezultatul referitor la frecvența bronșiectaziilor se completează de asemenea cu prevalența DAAT confirmat în rândul pacienților cu bronșiectazii, de doar 5.85%.

Referitor la simptome, am pornit cu ideea unei diferențe în ceea ce privește prezența *wheezing*-ului, având în vedere rezultatele altor studii. La pacienții cu DAAT, *wheezing*-ul este raportat în proporție de până la 76% în cursul infecțiilor respiratorii, activității fizice, expunerii la fum, prafuri și alergeni, fiind semnificativ mai scăzut la heterozigoții MZ comparativ cu homozigoți [46]. De asemenea, atunci când se compară pacienți cu DAAT și obstrucție bronșică, cu pacienți cu BPOC (evident, cu obstrucție), respectiv pacienți control, fără obstrucție, *wheezing*-ul ca manifestare acută, ca semn al unei agravări este semnificativ mai prezent în cazul pacienților cu DAAT [47]. Așadar diferența semnificativă clinic (41 vs. 28%) și statistic ($p=0.037$) privind prezența *wheezing*-ului ca simptom al pacientului testat cu, respectiv fără genotip modificat, nu este surprinzătoare.

Mai puțin așteptată a fost diferența între procentul de pacienți ce au prezentat tuse cronică, în grupul cu, respectiv fără modificări genetice (83 vs. 70%, $p=0.033$). Prezența tusei cronice poate fi interpretată în mai multe feluri. Pe de-o parte poate însemna infecții mai frecvente în rândul celor cu gene modificate, deși exacerbările par a fi la fel de frecvente la pacienții cu DAAT ca la cei cu BPOC fără DAAT [48], ele pot avea o lungime mai lungă [49], ducând la un număr mai mare de zile cu simptome.

Compararea valorilor AAT între genotipuri nu este o idee nouă, dimpotrivă; este evident că pacienții cu modificări genetice au valori mai scăzute decât cei normali, mai mult, valorile mai joase s-a dovedit a fi asociate cu PiZZ, dar și PiSZ și PiMZ [50]. Este însă pentru prima dată când o astfel de abordare vizează pacienți români. Deși testarea diferenței între oricare grupe ar fi fost utilă, aceasta nu s-a efectuat, considerându-se de la sine înțeleasă pentru alelele cele mai frecvente, M, Z și S, și fiind imposibil de testat pentru celelalte genotipuri (MRar, ZRar), având în vedere numărul prea mic de cazuri.

8. Analiza comparativă în cadrul pacienților cu BPOC, cu sau fără DAAT

Din totalul pacienților testați, un număr de 360 pacienți au avut diagnosticul de BPOC. Dintre aceștia, 22 au avut cel puțin o genă modificată (aceștia au fost incluși în lotul A), iar 338 nu au avut modificări semnificative la testările pentru identificarea DAAT (lotul B). Cele două loturi au fost comparate între ele.

- Ipoteza 1: Debut mai precoce al bolii la pacienții cu deficit de alfa-1 antitripsină: pentru această ipoteză au fost analizate: vârsta medie la momentul diagnosticului DAAT, vârsta la debutul primelor simptome pneumologice, durata simptomelor de la debut până în momentul diagnosticului. Diferență marginal nesemnificativă s-a constatat între cele două loturi doar între vârsta de debut al patologiei pulmonare (42.5 vs 51 ani, $p=0.10$), fără diferențe în ceea ce privește vârsta pacienților sau durata simptomelor.
- Ipoteza 2: Asociere mai semnificativă a emfizemului și a astmului bronșic în cazul pacienților cu DAAT: s-au testat frecvențele relative ale principalelor patologii testate (emfizem, bronșiectazii, astm bronșic, pneumotorax) – nu s-au evidențiat diferențe semnificative statistic. Mai mult, s-a obiectivat o frecvență mai mare a emfizemului în lotul fără DAAT, însă fără semnificație statistică. În schimb, s-a dovedit diferență semnificativă statistic în ceea ce privește prezența *wheezing*-ului (mai frecvent la pacienții cu DAAT, (45 vs 24.5%, $p=0.04$).
- Ipoteza 3: Severitate mai mare a bolii la pacientul cu DAAT: s-a evaluat urmărind diferențele între: stadiul BPOC corespunzător pacienților din fiecare lot, valoarea VEMS medie a fiecărui lot, valoarea AAT medie corespunzătoare fiecărui lot. Rezultatele au evidențiat o frecvență semnificativ mai mare a stadiului IV GOLD BPOC la pacienții din grupul cu DAAT (42.85 vs 19.10, $p=0.0092$), cu o valoare a VEMS marginal nesemnificativă între grupuri (33 vs 50%, $p=0.10$) și valoare a AAT semnificativ mai scăzută la grupul DAAT (106.55 vs 142.38 mg/dl, $p=0.0002$).
- Ipoteza 4: Fără diferențe privind istoricul și cuantumul tabagic: s-au testat frecvențele relative ale fiecărei categorii de fumător (fumător activ, exfumător, nefumător), precum și numărul de pachete an între cele două loturi. Nu s-au evidențiat diferențe semnificative statistic.

Discuții

Datele de literatură sugerează o vârstă de diagnostic a DAAT de 45.1 ± 10.9 ani, cu un debut mai precoce al simptomelor (39.1 ± 10.1 ani) și o întârziere medie a diagnosticului de DAAT de 6 ani, timp în care pacientul schimbă în medie 3.2 ± 2.4 doctori în încercarea de a descoperi diagnosticul [51]. Totuși, studiile au dovedit că impactul creșterii conștientizării bolii are efect pe scăderea întârzierii diagnosticului (de la 7.2 ± 8.3 ani în 1994 la 5.6 ± 8.5 ani) [52]. Studiul nostru a dovedit o vârstă medie de debut a patologiei respiratorii de 42.5 ani la pacientul cu DAAT, semnificativ mai scăzută decât în cazul pacientului fără DAAT.

Ca și comorbidități ale DAAT, emfizemul este considerat de cei mai mulți autori ca asociat DAAT în 70-85% din cazuri, de obicei cu predispoziție panlobulară [53]. Rezultatul comparării frecvențelor emfizemului în lotul A și B a relevat o frecvență mai mare în lotul fără DAAT (paradoxal), însă fără semnificație statistică. Rezultatul este neașteptat și îl interpretăm mai degrabă ca pe o lipsă a încrederii în investigația CT în ceea ce privește diagnosticul emfizemului (în țara noastră, la momentul actual). Pe de altă parte, diagnosticul de astm bronșic este greu de afirmat și greu de susținut pe de-o parte, dar și greu de combătut, pe de altă parte, la un pacient cu DAAT din mai multe motive. Cel mai adesea, pacientul este anterior cunoscut cu astm bronșic (ca o modalitate de a numi o boală obstructivă ce apare la o vârstă tânără) (conform unui studiu 50% din pacienții PiZZ au fost diagnosticați de către un medic cu astm bronșic în jurul vârstei de 38 ani [54]). Deși sunt ulterior testați și identificați cu DAAT, este dificil să se infirme diagnosticul de astm bronșic, cu atât mai mult cu cât o proporție însemnată din pacienții cu DAAT au reversibilitate bronșică la testul bronhodilatator, *wheezing*-ul este un simptom comun și frecvent la pacientul cu DAAT și până la o treime din pacienții cu DAAT au istoric alergic cunoscut și istoric de alergii pus de un medic [54]. Rezultatele obținute nu contravin datelor de literatură, cu atât mai mult cu cât populația testată este majoritar fumătoare (actual sau antecedent), așa cum se poate observa în cadrul testării ipotezei 4. Identificarea wheezingului ca particularitate clinică la pacientul cu DAAT este demnă de luat în seamă și de folosit.

Dovedirea unei severități crescute la pacientul cu DAAT, atât prin stadiul GOLD BPOC, cât și prin valoarea VEMS diferită (care deși marginal nesemnificativă, este înalt relevantă ca diferență clinică) este importantă nu atât la nivel de individ, cât mai ales la nivel de societate.

Faptul că un procent foarte mare de pacienți cu DAAT (42.85%) ajung să fie diagnosticați în stadiul IV al BPOC este un indicator foarte important și semnifică cu mai mare acuratețe întârzierea diagnosticului, cu impact major pe pârghiile terapeutice. De pildă,

dacă analizăm ghidurile internaționale [30] vom observa că terapia de augmentare nu este recomandată în stadiul IV (respectiv la un VEMS<30%), pornind de la considerentul că cea mai mare parte de distrucție s-a petrecut deja (o astfel de teorie începe să fie combătută din fericire).

Nu ne miră diferența semnificativă statistic privind valorile AAT. Este însă de menționat că valoarea medie a AAT în grupul DAAT se situează în intervalul normal de referință, de maximă importanță dacă ne gândim la practica medicală curentă în România, testarea valorii plasmatice atunci când suspectăm DAAT. Deși riscul de boală pulmonară este maxim la homozigoți, el nu este inexistent la heterozigoți [55,56], iar sensibilitatea metodei de testare prin prelevarea valorii plasmatice este foarte mică [57].

Referitor la pacienții investigați, având în vedere faptul că informațiile despre istoricul și cuantumul tabagic analizat sunt prelevate la momentul testării pentru DAAT, nu există motiv pentru a se suspecta o diferență între loturi. Cu toate acestea, s-a considerat utilă o astfel de analiză, ca punct de plecare pentru o ulterioară urmărire a acestor pacienți.

9. Analiza pacienților identificați cu DAAT

Pacienții ce au fost identificați cu un genotip anormal au fost invitați să participe la un studiu de aprofundare a testelor diagnostice (cu scopul ulterior al urmăririi). Au fost excluși de la posibilitatea de a participa la acest studiu: copiii cu vârsta sub 18 ani, femeile însărcinate, pacienții cu boli psihice semnificative și cei ce au dovada unei alte boli pulmonare semnificative ce ar putea influența rezultatele testărilor (tuberculoza activă sau sechelele semnificative de tuberculoză, alte boli infecțioase în faza acută sau de convalescență, hipertensiunea pulmonară idiopatică, proteinoza alveolară pulmonară, fibroza pulmonară idiopatică, alveolita alergică extrinsecă, sarcoidoza, fibroza chistică).

Un număr de 23 pacienți cu DAAT au fost evaluați, dintre care 15 bărbați. Vârsta medie la semnarea consimțământului informat este de 52.06 (minim 18, maxim 76) ani. Vârsta de debut al bolii pulmonare a fost de 41.82 ani. Întârzierea medie în diagnosticul DAAT a fost de 7.44 ani. Un număr de 11 (47.82%) pacienți nu au fumat niciodată, în timp ce proporția de fumători activi este foarte mică (4 pacienți, 17.39%). Valoarea plasmatică medie pentru lotul de pacienți cu DAAT (fie ei cu DAAT sever sau simpli purtători) a fost de 92.47 mg/dl, cu valori minime de 0 mg/dl (nedetectat) și maxime de 171 mg/dl.

Genotipurile pacienților investigați au fost dintre cele mai variate, astfel: 5 pacienți cu deficit sever de AAT (1 genotip ZZ, 1 genotip P_{Lowell}Z, 1 genotip SZ, 2 genotipuri rare:

QOamersfoort /Null și Z/14:94847391 A/G), și 18 pacienți cu deficit ușor (7 MZ, 7 MS, 2 MM_{Wurzburg}, 1 P_{Lowell}M, 1 IM).

Cea mai frecventă patologie respiratorie a pacienților a fost BPOC (14 din 23 pacienți).

Evaluând exclusiv pacienții cu BPOC, valorile VEMS variază între 16.4 și 95.3%, în timp ce valorile KCO între 38% și între 132.9%.

- Ipoteza 1: Analiza posibilelor interrelații între severitatea bolii obstructive pulmonare și particularități clinice. Ca și parametri clinici s-au utilizat: vârsta primelor simptome respiratorii, întârzierea diagnosticului de DAAT, numărul de PA, numărul de exacerbări, prezența diagnosticului de astm bronșic sau de bronșiectazii. S-au obținut cu semnificație statistică următoarele rezultate: corelație negativă înaltă între procentul din valoarea prezisă a VEMS-ului și numărul PA ($\rho=-0.694$, $p=0.05$), corelație pozitivă înaltă între volumul rezidual (exprimat ca procent din valoarea prezisă) și diagnosticul de astm bronșic ($\rho=0.710$, $p=0.014$) și o corelație rezonabilă negativă între capacitatea reziduală funcțională și vârsta de apariție a primelor simptome ($\rho=-0.549$, $p=0.05$). De asemenea, s-a obținut corelație rezonabilă, negativă, dar fără semnificație statistică, între vârsta de apariție a primelor simptome pe de-o parte, și volumul rezidual ($\rho=-0.509$, $p=0.114$) și capacitatea pulmonară totală ($\rho=-0.552$, $p=0.06$) (exprimate ca procent din valorile prezise) pe de altă parte.
- Ipoteza 2: Factori de prognostic în BPOC-ul sever. Am definit ca BPOC sever acel BPOC ce asociază o valoare fie a VEMS-ului, fie a KCO sub 50%. S-au evaluat ca posibili factori de risc: vârsta de debut a patologiei pulmonare, întârzierea diagnosticului, valoarea AAT, deficitul sever de AAT, statusul de fumător activ și de ex-fumător, expunerea la noxe, prezența hiperinflației, precum și numărul de PA. S-a folosit regresia logistică univariată. Nu s-au evidențiat rezultate semnificative statistic.

Discuții

Primul lucru care se remarcă este prezența foarte scăzută pentru evaluare completă, deși atât ca parte a discuției pretestare, cât și ca modalitate de anunț a deficitului, pacientul a fost informat de această posibilitate.

Vârsta medie a pacienților evaluați (52.06 ± 15.29 ani) se situează în limitele vârstelor pacienților cu DAAT evaluați la nivel mondial, dar de asemenea este o vârstă la care boala pulmonară este de regulă deja constituită. Este de remarcat și că întârzierea diagnosticului de

DAAT în lotul nostru (7.44 ± 5.88 ani) este comparabilă cu cea de acum 20 de ani la nivel mondial, și superioară celei actuale [52]. Acest lucru este firesc, dacă ne gândim că testarea pentru DAAT a deveni posibilă în România abia acum, în timp ce în alte țări a început în anii 70 [58].

S-a identificat o corelație negativă înaltă între procentul din valoarea prezisă a VEMS-ului și numărul PA, rezultat deloc neașteptat, care subliniază, încă o dată, rolul fumatului în procesul patogenetic în BPOC asociat cu DAAT. Un studiu mai vechi (dar pe un număr semnificativ mai mare de pacienți cu deficit sever) a dovedit rolul cuantumului tabagic în determinarea severității VEMS (OR: 1.09 (1.06-1.11)), alături de alte riscuri asociate unui VEMS scăzut (istoricul de fumat, istoricul de astm, bronșită cronică, pneumonie, cazul index) [59].

De asemenea, s-a evidențiat o corelație pozitivă înaltă între volumul rezidual (exprimat ca procent din valoarea prezisă) și diagnosticul de astm bronșic. Deși abordarea este nouă, nici acest rezultat nu este neașteptat, deoarece astmul bronșic poate agrava evoluția BPOC-ului [60,61] iar un dublu motiv de obstrucție bronșică poate duce, până la urmă, la un risc suplimentar de hiperinflație ca și complicație.

Nu s-au putut identifica la analiza univariată factori asociați cu BPOC-ul sever, așa cum a fost el definit (valoare a VEMS sau a KCO sub 50%). Posibile explicații se leagă de numărul mic de pacienți. Din acest motiv, întreaga analiză de regresie logistică ar trebui privită cu prudență datorită numărului mic de cazuri și repetată în momentul în care vor fi disponibile mai multe cazuri pentru analiză.

10. Concluzii și contribuții personale

Prezenta cercetare are câteva puncte forte. Primul dintre acestea este însăși abordarea temei, o temă orfană la nivel mondial, dar mai ales la nivel național. O astfel de temă poate avea rolul de a crește conștientizarea privind DAAT în rândul cadrelor medicale, primul pas ce trebuie făcut înainte de o detecție corespunzătoare și susținută a cazurilor de DAAT.

De o deosebită importanță este programul de detecție ținută a deficitului de alfa-1 antitripsină, deoarece creează mai multe premise sănătoase pentru continuarea luptei pentru conștientizarea și pentru tratarea DAAT. Faptul că prezentul studiu prezintă prevalențele principalelor gene identificate în populația la risc conferă un bun argument de demarare a procedurilor de includere a DAAT pe lista patologiilor ce trebuie să beneficieze de program național de tratament. De asemenea, o astfel de abordare ne aliniază în timp și spațiu cu

specialiștii europeni și mondiali, chiar dacă cu o întârziere semnificativă și cu un număr de cazuri identificate mult sub cel al țărilor civilizate.

Este important de dovedit că pacienții cu modificări genetice dovedite au comparativ cu pacienții fără anomalii genetice o severitate diferită. Faptul că pacienții cu BPOC și DAAT au o severitate mai mare (dovedită printr-un stadiul GOLD mai avansat și o valoare VEMS mai scăzută) nu este o informație eminamente utilă la nivel mondial, însă pe plan local este un argument important pentru care pacienții ar trebui diagnosticați mai precoce, prin intervenții active, ținute pe programe de detecție bine coordonate (care să pornească, la un moment dat, din interiorul țării). Din aceeași categorie se află și informația conform căreia pacienții cu BPOC și DAAT au o vârstă mai scăzută decât cei fără DAAT.

Pentru cunoașterea pacienților pe care de acum îi vom trata (sperăm că într-o bună zi și cu medicație specifică), evaluarea pneumologică complexă, precum și evaluarea posibilităților factori de risc pentru o patologie severă sunt obligatorii și au fost efectuate pe parcursul ultimei părți a prezentei lucrări.

Limite

Menționăm în primul rând dificultatea implicării pacienților pentru investigarea propriei boli. Din cei 59 pacienți identificați ca purtători au unei gene anormale până în octombrie 2017, lăsând la o parte cei 4 copii identificați, doar un număr de 23 pacienți s-au prezentat pentru teste suplimentare. Considerăm că acest lucru se datorează în mare parte lipsei educației pacienților, în primul rând prin lipsa discuției cu medicul curant (sau, în unele cazuri, sperăm cât mai puține, prin însăși lipsa de informare a acestuia), iar în al doilea rând prin lipsa imboldului necesar participării la controlul propriei boli. Nu trebuie să uităm faptul că ne-am adresat unei boli rare, iar de aici rezidă în primul rând numărul mic de pacienți.

Ca o altă limită semnificativă a acestui studiu, precizăm lipsa unei urmăriri în timp. În realitate, acest lucru a mers paralel cu identificarea, testarea pacienților și înregistrarea lor în Registrul Unic. Însă după identificarea individuală a pacienților, ne-am confruntat cu un număr foarte mic de cazuri (vorbit, totuși, despre o boală rară, iar acest lucru a fost tot timpul evident), cu genotipuri foarte variate, fiecare determinând o anumită patologie, ceea ce a făcut o urmărire coerentă, și mai ales o comparație între diverse genotipuri și patologii practic imposibilă în acest moment al studiului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Perciaccante A, Charlier P, Negri C, Coralli A, Appenzeller O, Bianucci R. Lessons from the Past: Some Histories of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Before Its Discovery. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis* 2018;15:1–3. doi:10.1080/15412555.2017.1421151.
- [2] Molino NA. Genetic predisposition to accelerated decline of lung function in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2:117–9.
- [3] DeMeo DL. 1-Antitrypsin deficiency {middle dot} 2: Genetic aspects of 1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004;59:259–64. doi:10.1136/thx.2003.006502.
- [4] Laurell C-B, Eriksson S. The Electrophoretic α_1 -Globulin Pattern of Serum in α_1 -Antitrypsin Deficiency. *Scand J Clin Lab Investig* 1963;15:132–40. doi:10.1080/00365516309051324.
- [5] Stoller JK, Aboussouan LS. A review of α_1 -antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:246–59. doi:10.1164/rccm.201108-1428CI.
- [6] Stoller JK, Aboussouan LS. α_1 -antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365:2225–36.
- [7] 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;13:114. doi:10.1186/s13023-018-0856-9.
- [8] Luisetti M, Seersholm N. α_1 -Antitrypsin deficiency ? 1: Epidemiology of α_1 -antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:164–70.
- [9] Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol* 2006;27:77–84. doi:10.1183/09031936.06.00062305.
- [10] De Serres FJ, Blanco I, Fernández-Bustillo E. PI S and PI Z Alpha-1 antitrypsin deficiency worldwide. A review of existing genetic epidemiological data. *Monaldi Arch Chest Dis - Pulm Ser* 2007;67:184–208. doi:10.4081/monaldi.2007.476.
- [11] Ulmeanu R, Nebunoiu A-M, Mihaltan FD, Deleanu OC. DEFICITUL DE ALFA-1 ANTITRIPSINĂ – REPERE PRACTICE PENTRU CLINICIAN. *Med Interna (Bucur)* 2013. <http://www.medicina-interna.ro/articol.php?articol=813> (accessed July 24, 2014).
- [12] Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:16. doi:10.1186/1750-1172-3-16.
- [13] Saunders DN, Tindall EA, Shearer RF, Roberson J, Decker A, Wilson JA, et al. A

- novel SERPINA1 mutation causing serum alpha(1)-antitrypsin deficiency. PLoS One 2012;7:e51762. doi:10.1371/journal.pone.0051762.
- [14] Ekeowa UI, Marciniak SJ, Lomas D a. A(1)-Antitrypsin Deficiency and Inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:243–52. doi:10.1586/eci.10.95.
 - [15] Mulgrew AT, Taggart CC, McElvaney NG. Alpha-1-antitrypsin deficiency: current concepts. *Lung* 2007;185:191–201. doi:10.1007/s00408-007-9009-y.
 - [16] Fairbanks K, Tavill A. Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2136–2141. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.01955.x.
 - [17] de Serres FJ, Blanco I, Fernández-Bustillo E. Genetic epidemiology of alpha-1 antitrypsin deficiency in North America and Australia/New Zealand: Australia, Canada, New Zealand and the United States of America. *Clin Genet* 2003;64:382–97.
 - [18] Townsend SA, Edgar RG, Ellis PR, Kantas D, Newsome PN, Turner AM. Systematic review: the natural history of alpha-1 antitrypsin deficiency, and associated liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;47:877–85. doi:10.1111/apt.14537.
 - [19] Pferdmenges D, Baumann U, Müller-Heine A, Framke T, Pfister E-D. Prognostic Marker for Liver Disease due to Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Klin Pädiatrie* 2013;225:257–62. doi:10.1055/s-0033-1347196.
 - [20] Needham M, Stockley RA. Alpha 1-antitrypsin deficiency. 3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax* 2004;59:441–5.
 - [21] Bergin D a, Hurley K, McElvaney NG, Reeves EP. Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60:81–97. doi:10.1007/s00005-012-0162-5.
 - [22] Zaharie A-M, Mihaltan FD, Ulmeanu R. Alpha-1 antitrypsin deficiency: another COPD? | *Revista Societatii Romane de Pneumologie. Pneumologia* 2018;67:57–60.
 - [23] Dahl M, Nordestgaard BG. Markers of early disease and prognosis in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2009;4:157–67.
 - [24] Sveger T. Prospective study of children with α 1-antitrypsin deficiency: Eight-year-old follow-up. *J Pediatr* 1984;104:91–4. doi:10.1016/S0022-3476(84)80599-5.
 - [25] Stoller JK, Smith P, Yang P, Spray J. Physical and social impact of alpha 1-antitrypsin deficiency: results of a survey. *Cleve Clin J Med* n.d.;61:461–7.
 - [26] Catherine, Carroll T, O'Brien G, McElvaney NG. *European respiratory journal*. vol. 40. ERS Journals; 2012.
 - [27] Parr DG, Lara B. Clinical utility of alpha-1 proteinase inhibitor in the management of adult patients with severe alpha-1 antitrypsin deficiency: a review of the current

- literature. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:2149–62. doi:10.2147/DDDT.S105207.
- [28] Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977;1:1645–8.
- [29] Dawkins PA, Dawkins CL, Wood AM, Nightingale PG, Stockley JA, Stockley RA. Rate of progression of lung function impairment in α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2009;33:1338–44. doi:10.1183/09031936.00061208.
- [30] American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:818–900. doi:10.1164/rccm.168.7.818.
- [31] Marciniuk DD, Hernandez P, Balter M, Bourbeau J, Chapman KR, Ford GT, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency targeted testing and augmentation therapy: a Canadian Thoracic Society clinical practice guideline. *Can Respir J* 2012;19:109–16.
- [32] Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M, Alpha- N. RECOMMENDATIONS OF THE SPANISH SOCIETY OF PULMONOLOGY Guidelines for the Diagnosis and Management of α_1 -Antitrypsin Deficiency 2006:119–29.
- [33] Stolk J, Putter H, Bakker EM, Shaker SB, Parr DG, Piitulainen E, et al. Progression parameters for emphysema: a clinical investigation. *Respir Med* 2007;101:1924–30. doi:10.1016/j.rmed.2007.04.016.
- [34] Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Koblicez 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;50:1700610. doi:10.1183/13993003.00610-2017.
- [35] Survival and FEV₁ Decline in Individuals with Severe Deficiency of α_1 -Antitrypsin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:49–59. doi:10.1164/ajrccm.158.1.9712017.
- [36] DIRKSEN A, DIJKMAN JH, MADSEN F, STOEL B, HUTCHISON DCS, ULRIK CS, et al. A Randomized Clinical Trial of α_1 -Antitrypsin Augmentation Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1468–72. doi:10.1164/ajrccm.160.5.9901055.
- [37] Dirksen A, Piitulainen E, Parr DG, Deng C, Wencker M, Shaker SB, et al. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in α_1 -antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2009;33:1345–53. doi:10.1183/09031936.00159408.
- [38] Greulich T, Averyanov A, Borsa L, Rozborilová E, Vaicius D, Major T, et al. European screening for alpha₁ -antitrypsin deficiency in subjects with lung disease. *Clin Respir J* 2017;11:90–7. doi:10.1111/crj.12310.

- [39] Serapinas D, Sakalauskas R. Sensitivity of alpha-1 antitrypsin level for inherited deficiency detection in COPD patients. *Pneumologia* n.d.;61:34–6.
- [40] 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. *Adv Exp Med Biol* 2013;756:29–37. doi:10.1007/978-94-007-4549-0_5.
- [41] Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Sliwinski P, Wajda B, Czajkowska-Malinowska M. The National Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Registry in Poland. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis* 2015;12:22–6. doi:10.3109/15412555.2015.1021915.
- [42] Sitkauskiene B, Serapinas D, Blanco I, Fernández-Bustillo E, Janciauskiene S, Sakalauskas R, et al. Screening for alpha1-antitrypsin deficiency in Lithuanian patients with COPD. *Respir Med* 2008;102:1654–8. doi:10.1016/j.rmed.2008.07.003.
- [43] Greulich T, Nell C, Herr C, Vogelmeier C, Kotke V, Wiedmann S, et al. Results from a large targeted screening program for alpha-1-antitrypsin deficiency: 2003 - 2015. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:75. doi:10.1186/s13023-016-0453-8.
- [44] Carroll TP, O'Connor CA, Floyd O, McPartlin J, Kelleher DP, O'Brien G, et al. The prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency in Ireland. *Respir Res* 2011;12:91. doi:10.1186/1465-9921-12-91.
- [45] Ferrarotti I, Gorrini M, Scabini R, Ottaviani S, Mazzola P, Campo I, et al. Secondary outputs of alpha1-antitrypsin deficiency targeted detection programme. *Respir Med* 2008;102:354–8.
- [46] Eden E, Strange C, Holladay B, Xie L. Asthma and allergy in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med* 2006;100:1384–91. doi:10.1016/J.RMED.2005.11.017.
- [47] EDEN E, MITCHELL D, MEHLMAN B, KHOULI H, NEJAT M, GRIECO MH, et al. Atopy, Asthma, and Emphysema in Patients with Severe α -1-Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:68–74. doi:10.1164/ajrccm.156.1.9508014.
- [48] Needham M, Stockley RA. Exacerbations in {alpha}1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2005;25:992–1000. doi:10.1183/09031936.05.00074704.
- [49] Vijayarathna K, Stockley RA. Relationship between frequency, length, and treatment outcome of exacerbations to baseline lung function and lung density in alpha-1 antitrypsin-deficient COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:789–96. doi:10.2147/COPD.S31797.
- [50] Dahl M, Nordestgaard BG. Markers of early disease and prognosis in COPD. *Int J*

Chron Obstruct Pulmon Dis 2009;4:157–67.

- [51] Köhnlein T, Janciauskiene S, Welte T. Diagnostic delay and clinical modifiers in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Ther Adv Respir Dis* 2010;4:279–87. doi:10.1177/1753465810376407.
- [52] Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in Diagnosis of α 1-Antitrypsin Deficiency. *Chest* 2005;128:1989–94. doi:10.1378/chest.128.4.1989.
- [53] Stavngaard T, Shaker SB, Dirksen A. Quantitative assessment of emphysema distribution in smokers and patients with α 1-antitrypsin deficiency. *Respir Med* 2006;100:94–100. doi:10.1016/j.rmed.2005.04.001.
- [54] Eden E, Strange C, Holladay B, Xie L. Asthma and allergy in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Med* 2006;100:1384–91. doi:10.1016/j.rmed.2005.11.017.
- [55] Hersh CP, Dahl M, Ly NP, Berkey CS, Nordestgaard BG, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:843–9. doi:10.1136/thx.2004.022541.
- [56] Molloy K, Hersh 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;189:419–27. doi:10.1164/rccm.201311-1984OC.
- [57] Serapinas D, Sakalauskas R. Sensitivity of alpha-1 antitrypsin level for inherited deficiency detection in COPD patients. *Pneumologia* n.d.;61:34–6.
- [58] Laurell CB, Sveger T. Mass screening of newborn Swedish infants for alpha antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet* 1975;27:213–7.
- [59] Demeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2007;62:806–13. doi:10.1136/thx.2006.075846.
- [60] Eden E, Hammel J, Rouhani FN, Brantly ML, Barker AF, Buist AS, et al. Asthma features in severe alpha1-antitrypsin deficiency: experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest* 2003;123:765–71.
- [61] Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a Risk Factor for COPD in a Longitudinal Study. *Chest* 2004;126:59–65. doi:10.1378/chest.126.1.59.

LISTĂ LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Zaharie A-M**, Mihălțan FD, Ulmeanu R. AATD-Another COPD? *Pneumologia* 2018;67(2):57-61, revista BDI, <https://www.pneumologia.eu/en/alpha-1-antitrypsin-deficiency-another-copd>
2. **Zaharie A-M**, Antoniu S, Chorostowska Wynimki J, Mihălțan FD, Deleanu OC, Mahler B, Davidescu L, Arghir OC, Ulmeanu R. Romanian Pilot Study of Apha-1 Antitrypsin Detection - Feasibility and Challenges. *REV.CHIM. (Bucharest)* 2018; 69(5):1152-1155, ISSN 2537-5733, revista ISI, factor de impact: 1.232, http://www.revistadechimie.ro/article_ro.asp?ID=6279
3. **Nebunoiu A-M**, Deleanu OC, Rohan I, Mihălțan F, Chorostowska-Wynimko J, Ulmeanu R. Alpha-1 antitrypsin deficiency, SZ phenotype: a rare type of a rare disease. Case report. *Pneumologia* 2014 oct-dec; 63(4):218-223. ISSN 2067-2993, revista BDI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665366>
4. Ulmeanu R, **Nebunoiu A-M**, Mihălțan FD, Deleanu OC. Deficitul de alfa-1 antitripsină – repere practice pentru clinician - *MEDICINA INTERNA*, nr 5/ 2013, volumul X, ISSN 1220-5818, revista BDI, <http://www.medicina-interna.ro/articol.php?articol=813>

Lucrări științifice prezentate în cadrul unor congrese și conferințe naționale și internaționale, cu rezumat tipărit în volum special sau revistă:

1. **Zaharie A**, Ulmeanu R. Abordarea terapeutică în deficitul de alfa1-antitripsina A IV-a Conferință a Secțiunii de Tuberculoză a SRP, A VII-a Conferință Națională de Fiziopatologie Respiratorie, Young Respiratory Academy, ediția a II-a, 19-21 aprilie 2018, Sinaia
2. **Zaharie A-M**, Ulmeanu R, Mihălțan F, Davidescu L. Alpha-1 antitrypsin deficiency screening in Romania: first four years. East-Central European Conference of Pulmonology, 12th -13th May 2017, Pécs, Hungary;
3. **Zaharie A**, Ulmeanu R. 3. AAT deficit as a COPD phenotype / Deficitul de alfa-1 antitripsină - un fenotip în BPOC. Academia tinerilor pneumologi, 27-29 aprilie 2017, București

4. Coșei VC, **Zaharie A**, Popa C, Deleanu O, Arghir O, Mihălțan F, Ulmeanu R. Deficitul de alfa1-antitripsina – adevăr sau provocare? Academia tinerilor pneumologi, 27-29 aprilie 2017, București
5. **Zaharie A**. Locul deficitului de alfa-1 antitripsina în patologia pneumologică (și nu numai)/ The role of alpha-1 antitrypsin deficiency in pulmonary pathology (and not only). Al 24-lea Congres National al Societății Române de Pneumologie, 5-8 octombrie 2016, Poiana Brașov
6. **Zaharie A**, Deleanu O. Implicarea deficitului de alfa-1 antitripsină în cancerul bronho-pulmonar / The involvement of alpha – 1 antitrypsin deficiency in lung cancer. Al 24-lea Congres National al Societății Române de Pneumologie, 5-8 octombrie 2016, Poiana Brașov
7. Ulmeanu R, **Zaharie A-M**, Davidescu L, Antoniu S, Teleaga C, Deleanu O, Arghir O, Tudorache E. Noutăți legate de Deficitul de alfa 1 antitripsină în România/ Novelties regarding alpha-1 antitrypsin deficiency in Romania. Al 24-lea Congres National al Societății Române de Pneumologie, 5-8 octombrie 2016, Poiana Brașov
8. **Zaharie A-M**. Exacerbările în deficitul de alfa-1 antitripsină / Exacerbations in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Al 24-lea Congres National al Societății Române de Pneumologie, 5-8 octombrie 2016, Poiana Brașov
9. Ulmeanu R, **Zaharie A-M**, Chorostowska Wynimko J, Deleanu OC, Mihălțan FD. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency in Romania - First Steps (Results of First Three Years of Screening). American Thoracic Society International Conference, May 13-May 18, 2016 San Francisco, California, p.A1574, factor de impact: 13.20, https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1_MeetingAbstracts.A1574
10. **Zaharie A-M**, Mihălțan FD, Popa C, Deleanu OC, Ulmeanu R. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency - Do We Really Understand It? Case Presentations. American Thoracic Society International Conference, May 13-May 18, 2016 San Francisco, California, p.A1576, factor de impact: 13.20, https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1_MeetingAbstracts.A1576
11. Deleanu OC, **Nebunoiu A-M**. Deficitul de Alfa 1 Antitripsină și cancerul – există o legătură? A doua conferință națională de cancer pulmonar și prima conferință națională de boli pulmonare rare. 2-4 aprilie 2015, Băile Felix.
12. **Nebunoiu A-M**, Deleanu OC, Mihălțan FD, Ulmeanu R. Spectrul modificărilor pulmonare în deficitul de Alfa-1 Antitripsină - dinspre comun spre neașteptat. A doua

conferință națională de cancer pulmonar și prima conferință națională de boli pulmonare rare. 2-4 aprilie 2015, Băile Felix.

13. **Nebunoiu A-M**, Deleanu OC, Ulmeanu R. Când trebuie să testăm deficitul de alfa-1 antitripsină? Al 23-lea Congres al Societății Române de Pneumologie, Sibiu, 8-11 Octombrie 2014, CD rezumate

14. Ulmeanu R, Deleanu O, **Nebunoiu A**. Deficitul de alfa 1 antitripsină în România – ce știm și ce trebuie să știm? (Proiectul Leonardo da Vinci-partener Institutul de Pneumoftiziologie “Marius Nasta”) Al 23-lea Congres al Societății Române de Pneumologie, Sibiu, 8-11 Octombrie 2014, CD rezumate

15. Ulmeanu R, **Nebunoiu A**. Deficitul de alfa 1 antitripsina în “comorbidomul” BPOC. Al 23-lea Congres al Societății Române de Pneumologie, Sibiu, 8-11 Octombrie 2014, CD rezumate

16. Ulmeanu R, **Nebunoiu A-M**, Deleanu OC. Deficitul de alfa 1 antitripsină în România, Europa Centrală și de Est – ce știm și ce trebuie să știm? (Proiectul Leonardo da Vinci) – A 46-a Sesiune Științifică a Institutului de Pneumoftiziologie „Marius Nasta” București, București, 11 aprilie 2014

17. Nedelcu R, Deleanu O, **Nebunoiu A**, Cartacuzencu I, Mihălțan FD. Asocieră rară între deficitul de alfa 1 antitripsină și aspergilomul intracavitar. Al 11-lea Congres Național de Medicină Internă, Călimănești-Căciulata, 30 martie-2aprilie 2011, volumul VIII de rezumate, pag. 120-121

Lucrări științifice prezentate în cadrul unor congrese și conferințe naționale și internaționale, fără rezumat tipărit în volum special sau revistă:

1. **Zaharie A**, Ulmeanu R, Mihălțan F. Deficitul de alfa-1 antitripsină - ce (mai) putem preveni? Conferința de management de boli cronice respiratorii, 22-23 iunie 2018, București

2. Ulmeanu R, **Zaharie A**, Antoniu S, Davidescu L, Arghir O, Tudorache E. DAAT în România: unde ne aflăm? A II-a Conferință de Boli Pulmonare Rare, 13-15 Octombrie 2017, Oradea

3. **Zaharie A**, Ulmeanu R, Mihălțan F. Deficitul de alfa-1 antitripsină - ce (mai) putem preveni? Conferința de management de boli cronice respiratorii, 22-23 iunie 2018, București

4. **Zaharie A**, Ulmeanu R. Evaluarea prognosticului în deficitul de alfa-1 antitripsină. A II-a Conferință de Boli Pulmonare Rare, 13-15 Octombrie 2017, Oradea

5. **Zaharie A**, Popa C, Deleanu O, Arghir O, Ulmeanu R. A surprising verdict: Alpha 1 antitrypsin deficiency. 2nd Central and Eastern European Alpha-1 Network Conference, October 16-17th, 2015, Warsaw, Poland.
6. Ulmeanu R, **Zaharie A**, Davidescu L, Deleanu O, Teleaga C, Antoniu S, Tudorache E, Mihălțan F. Alpha 1 antitrypsin deficiency in Romania – preliminary results from the genetic screening (2012-2014). 2nd Central and Eastern European Alpha-1 Network Conference, October 16-17th, 2015, Warsaw, Poland.
7. Ulmeanu R, Deleanu O, **Nebunoiu A**. Epidemiologia Deficitului de alfa 1 antitripsină în Europa centrală și de est - ce cunoaștem în realitate? Managementul Bolilor Pulmonare, București 18-19 octombrie 2013
8. Ulmeanu R, Deleanu O, **Nebunoiu A**, Epidemiologia deficitului de alfa 1 antitripsină în Europa Centrală și de Est - ce cunoaștem în realitate? A III-a Conferința Națională Managementul Bolilor Pulmonare, București, 18-19 octombrie 2013
9. Deleanu O, **Nebunoiu A-M**, Ulmeanu R. Deficitul de alfa-1 antitripsină - o condiție moștenită cvasinecunoscută. Prezentare orală la Sesiunea lunară a SRP-Filiala București din 23 ianuarie 2013, Institutul de Pneumologie "Marius Nasta", București