● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ ششم، شمارهٔ ۱، ص ۲۲-۱۷، ۱۳۷۷

مقالهٔ پژوهشی

مقایسهٔ فنوتیپ‌های آلفا-۱- آنتی‌تریپسین در گروهی از بیماران HBsAg مثبت مبتلا و غیر مبتلا به سیروز کبدی در تهران

دکتر عباس صاحبقدم لطفی[۱]، دکتر رضا ملک‌زاده[۲] و بهزاد میلانی[۳]

خلاصه

آلفا -۱- آنتی‌تریپسین (α_1At) از عمده‌ترین سرین پروتئازهای سرم است. این پروتئین دارای فنوتیپ‌های مختلف می‌باشد که برخی از آنها مانند PiMS, PiM1Z, PiMZ باعث ایجاد نقص در سیستم (α_1At) می‌گردند. در اثر نقص سیستم α_1At بافت‌های مختلف مورد آسیب قرار می‌گیرند. از جمله این بافت‌ها می‌توان، کبد، ریه و کلیه را نام برد. در این مطالعه ۶۰ نفر بیمار در محدودهٔ سنی ۷ تا ۶۵ سال و ۲۸ نفر فرد سالم در همان محدوده سنی به عنوان کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. افراد کنترل با تأیید پزشک و بر اساس اندازه گیری آنزیم‌های کبدی دارای کبد سالم و HBsAg منفی بودند. بیماران بر اساس نظریه پزشک معالج و پاتولوژیست به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل افرادی بود که فقط HBsAg مثبت بوده ولی سیروز کبدی نداشتند و گروه دوم شامل بیمارانی می‌شد که طبق گزارش آزمایش بیوپسی کبد و نظر پاتولوژیست مبتلا به سیروز بوده و HBsAg آنها نیز مثبت بود. در هر دو گروه بیمار و گروه کنترل فعالیت α_1At سرم با توجه به میزان کاهش فعالیت آنزیم تریپسین اندازه گیری و محاسبه شد، فنوتیپ‌های α_1At نیز در آنها با استفاده از روش الکتروفورز کانونی بر روی ژل پلی‌آکریل آمید تعیین گردید. شیوع PiMM در افراد کنترل ۱۰۰٪ و در افراد HBsAg مثبت PiMM ۸۰٪، PiM_2 ۱۱٪ و PiMS ۳/۱۴٪ بود. با مقایسهٔ فراوانی نسبی فنوتیپ‌های طبیعی و غیرطبیعی بین افراد کنترل (گروه اول) و افراد با HBsAg مثبت (گروه دوم) و نیز افراد HBsAg مثبت که مبتلا به سیروز هم بودند (گروه سوم)، اختلاف معنی‌داری بین آنها در نوع فنوتیپ‌ها مشاهده گردید ($P<0/05$). از نتایج این مطالعه چنین بر می‌آید افرادی که دارای نقص در سیستم α_1At هستند، اگر دچار عفونت ویروسی هپاتیت از نوع ویروس HBV شوند، احتمال ابتلای آنها به سیروز کبدی بالاتر از افرادی است که از نظر فنوتیپ α_1At طبیعی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آلفا -۱- آنتی‌تریپسین α_1At، سیروز کبدی، الکتروفورز کانونی، HBsAg

۱ـ استادیار بیوشیمی بالینی دانشکده علوم پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس، ۲ـ استاد گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران

۳ـ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی

مقدمه

کبد موضع اصلی بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات عروقی، التهاب، اختلالات متابولیسمی، آسیب‌های سمی و نئوپلاسم‌ها می‌باشد. التهاب کبد یا هپاتیت به دلایل مختلفی از قبیل واکنش در برابر داروها و سموم و عفونت‌هایی مانند مالاریا، سالمونلا و غیره که موجب هپاتیت ثانویه می‌گردند، روی می‌دهد (۱،۵). عمده‌ترین عفونت‌هایی که کبد را درگیر می‌کند هپاتیت ویروسی است. این نوع هپاتیت، نوعی التهاب حاد است که معمولاً به وسیله ویروس‌های هپاتیت A(HAV)، هپاتیت B(HBV) و یا هیچ‌کدام از انواع A و B (سایر انواع) ایجاد می‌گردد (۹). هپاتیت B شایع‌تر از سایر انواع بوده و دوره کمون طولانی داشته و معمولاً مزمن می‌باشد. مراکز کنترل بیماری در آمریکا گزارش داده‌اند که همه ساله بیش از ۳۰۰۰۰۰ مورد جدید و بالغ بر یک میلیون حامل بیماری در ایالات متحده وجود دارد. همچنین توسط همان مراکز اعلام شده است که در هر سال ۴۰۰۰ نفر به علت هپاتیت منجر به سیروز یا کارسینومای سلول‌های کبدی فوت می‌نمایند (۱،۴).

یکی از دلایل بالا رفتن احتمال بروز اختلالات کبدی، نقص در سیستم آلفا -۱- آنتی‌ترپسین α_1At است (۵،۱۲). بر اساس مطالعات انجام شده در جمعیت‌های مختلف، خطر توسعه بیماری مزمن کبدی برای مردان هتروزیگوت بین سنین ۴۰ تا ۵۰ سالگی ۶ تا ۱۵٪ است و برای افراد هموزیگوت این احتمال خیلی بیشتر می‌باشد (۴،۹،۱۰). در این مطالعه به منظور بررسی ارتباط انواع فنوتیپ با نوع بیماری واینکه آیا فنوتیپ‌های در معرض خطر مثل MZ، MS می‌توانند در تبدیل هپاتیت B به سیروز مؤثر باشند، ۲۴ بیمار سیروزی ناشی از هپاتیت B و ۳۶ بیمار مبتلا به هپاتیت B غیر سیروزی و همچنین ۲۸ فرد سالم، مورد مطالعه و بررسی و تعیین فنوتیپ‌ها قرار گرفتند. افراد بیمار همگی در سازمان انتقال خون تهران پرونده داشته و تحت کنترل و درمان بوده و گروه دوم بیماران بر اساس نظر پاتولوژیست و آزمایش بیوپسی کبد مبتلا به سیروز بوده و بر اساس سوابق، قبلاً مبتلا به هپاتیت B بوده‌اند.

مواد و روش کار

در این تحقیق از افرادی نمونه گیری شد که مراجعات مکرر به بخش هپاتیت سازمان انتقال خون یا بیمارستان دکتر شریعتی تهران داشتند. در مورد ابتلاء آنان به ویروس HBV به کمک تست‌های بیوپسی کبد و گزارش پاتولوژیست و پرونده‌های سازمان انتقال خون اطمینان حاصل شد. ضمناً با توجه به سوابق پرونده و گزارش پاتولوژیست این افراد به دو گروه سیروزی و غیر سیروزی تفکیک شدند.

از هر فرد ۳ میلی‌لیتر خون گرفته شد (بدون ماده ضدانعقاد). بعد از جدا کردن سرم، نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های کوچک تقسیم شده و تا هنگام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده سه آزمایش تعیین فنوتیپ α_1At به روش الکتروفورز کانونی و تعیین فعالیت آنزیم از طریق ظرفیت مهاری ترپسین (TIC) و نیز الکتروفورز پروتئین سرم بر روی سلولز استات انجام شد.

الکتروفورز کانونی بر روی ژل بسیار نازک (۰/۲mm) آکریل آمید انجام گردید (۴). برای ساختن ژل ۱/۳ میلی‌لیتر محلول آکریل آمید/بیس آکریل آمید (۳۰٪ =T) با ۰/۵ میلی‌لیتر فارمالیت با pH ۴/۹-۴/۲ و ۶ میلی‌لیتر گلیسرول ۱۶٪ مخلوط گردید. سپس به این محلول ۵ میکرولیتر تمد (تترامتیل اتیلن ـ دی آمین = TEMED) و ۱۵ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۴۰٪ اضافه شد. بعد از تهیه ژل، فوکوس مقدماتی به میزان ۱۸۰۰ ولت ساعت انجام شد (۱)، سپس نمونه گذاری انجام شده و الکتروفورز به میزان ۳۰۰۰ ولت ساعت ادامه یافت. لازم به ذکر است که تمام مراحل الکتروفورز در توان ثابت به انجام رسید. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل درون محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو R-250 به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس ژل را در محلول رنگ‌زدا قرار داده تا زمینه ژل کاملاً بی‌رنگ شود. بعد از رنگ‌زدایی، الگوی الکتروفورزی نمونه‌ها با الگوی الکتروفورزی مربوط به فنوتیپ‌های سرم استاندارد تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس α_1 آنتی‌ترپسین نروژ مربوط به پروفسور فاگرول (۸) مقایسه شد و فنوتیپ‌های α_1At در نمونه‌های بیمار و کنترل، تعیین گردید.

فعالیت α_1At نمونه‌های سرم به روش آنزیمی بر اساس مهار ترپسین انجام می‌شود (۵). در این روش هر بار می‌توان ۱۵ نمونه سرم را آزمایش نمود و در هر سری آزمایش شدت جذب نمونه‌ها را نسبت به شدت جذب نمونه کنترل آلبومین سنجید. نمونه‌های سرم بوسیله بافر تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان، PH=۸/۲) به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق می‌گردد.

به همراه هر نمونه سرم یک لوله آزمایش شاهد نیز در نظر گرفته شد و آزمایش به صورت دو بار تکرار انجام گردید. بعد از رقیق کردن نمونه‌های سرم ۲ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده سرم با ۲ میلی‌لیتر محلول رقیق شده ترپسین مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه به هر یک از لوله‌های شاهد و نمونه سرم ۵ میلی‌لیتر محلول آلفا N- بنزوئیل دی ـ ان ـ آرژینین پارانیتروآنیلید (BAPNA) که در حلال دی متیل سولفوکسید حل شده بود افزوده شده و پس از هم زدن کامل لوله‌ها، جذب هر نمونه نسبت به شاهد همان نمونه

در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس اختلاف جذب هر نمونه نسبت به کنترل آلبومین محاسبه و بر اساس رابطه زیر ظرفیت مهاری تریپسین که همان فعالیت آنزیم α_1At است اندازه گیری گردید:

$$TIC=\frac{7000}{10.5}\frac{\Delta A}{X.Y}$$ ظرفیت مهاری تریپسین بر حسب میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر

که X حجم سرم رقیق شده، و Y زمان اینکوباسیون در ۳۷° بر حسب دقیقه و ΔA اختلاف جذب نمونه سرم نسبت به کنترل آلبومین و ۱۰/۵ ضریب خاموشی محصول واکنش تریپسین و BAPNA بر حسب دقیقه و ۷۰۰۰ حجم کل هر لوله بر حسب میکرولیتر می‌باشد. ضمناً برای همه نمونه‌های سرم بیماران و افراد کنترل الکتروفورز پروتئین‌های سرم روی استات سلولز توسط دستگاه هلنا نیز انجام شد.

نتایج

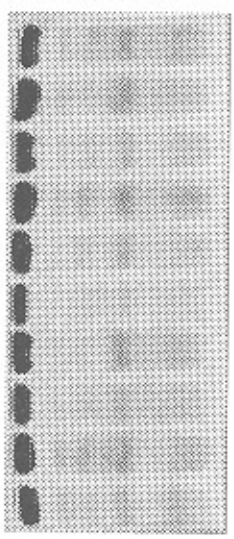
۶۰ نمونه سرم بیمار و ۲۸ نمونه سرم طبیعی مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان ۶۰ بیمار ۲۴ نفر مبتلا به سیروز و ۳۶ نفر غیر سیروزی بودند. در جامعه بیمار ۱۳ نفر مؤنث و ۴۷ نفر مذکر بودند. فراوانی و فراوانی نسبی فنوتیپ‌ها در نمونه‌های بیمار و طبیعی در جدول ۱ آمده است. شکل ۱ نیز فراوانی و فراوانی نسبی فنوتیپ‌ها α_1At را در دو گروه نشان می‌دهد.

جدول ۱: *فراوانی و فراوانی نسبی فنوتیپ‌های α_1At در بیماران و افراد طبیعی*

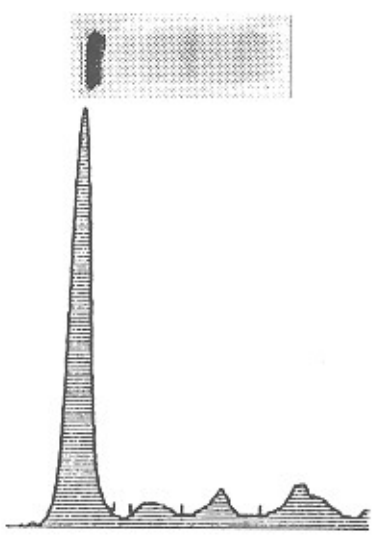
فنوتیپ‌ها	افراد طبیعی		بیماران	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
MM	۱۶	۵۷/۱	۳۳	۵۵
M1M2	۱۲	۴۲/۹	۱۵	۲۵
MZ	-	-	۲	۳/۳۳
MS	-	-	۱	۱/۶۷
M1Z	-	-	۶	۱۰
M1S	-	-	۱	۱/۶۷
UN (نامشخص)	-	-	۲	۳/۳۳
جمع	۲۸	۱۰۰	۶۰	۱۰۰

کاهش باند α_1 در الکتروفروگرام بیماران نسبت به گروه کنترل مؤید کمبود فعالیت آنزیم α_1At در جامعه بیمار می‌باشد.

همانگونه که قبلاً اشاره شد، در این تحقیق ۶۰ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. این ۶۰ بیمار همگی HBsAg مثبت و بر اساس نتایج حاصل از پرونده‌های این افراد ۲۴ نفر مبتلا به سیروز بودند. در گروه سیروزی‌ها فراوانی فنوتیپ‌های PiMM برابر با ۱۰، PiM1M2 برابر با ۷، PiM1S برابر با ۱، PiM1Z برابر با ۴، PiMS و PiMZ هر کدام برابر با یک درصد بود. در گروه HBsAg مثبت غیر سیروزی نیز فراوانی فنوتیپ‌های PiMM برابر با ۲۳،



الف: *الکتروفورگرام سرم بر روی کاغذ استات سلولز*



ب: *نمودار پروتئین‌های سرم یکی از بیماران*

شکل ۱: *نمونه‌ای از الکتروفورگرام پروتئین‌های سرم بیماران*

PiM1M2 برابر با ۸، PiM1Z برابر با ۲، PiMZ برابر با ۱ درصد بوده و PiM1S و PiMS نیز وجود نداشت. با استفاده از آزمون فیشر بین افراد مبتلا و غیر مبتلا به سیروز و نیز بین گروه HBsAg مثبت (بیماران) و گروه HBsAg منفی (کنترل) به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در انواع فنوتیپ‌ها به ویژه در فنوتیپ‌های غیر طبیعی S, Z وجود داشت ($P\leq ۰/۰۵$).

بحث

بر اساس تحقیقات مختلف خطر ابتلاء به سیروز کبدی در افراد بزرگسالی که دچار کاهش فعالیت آنزیم α_1 آنتی‌تریپسین (AATD) می‌باشند حدود ۱۰٪ است (۱,۶,۱۰). در یک تحقیق انجام شده در تایلند نیز ارتباط فنوتیپ‌های غیرطبیعی α_1At با هپاتوما و سیروز کبدی مشخص گردیده است (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی تعدادی بیمار بالغ صورت گرفته مشخص گردیده است که خطر ایجاد بیماری مزمن کبدی در افراد هتروزیگوت (AATD) ۱/۸ برابر افرادی است که با کمبود فعالیت α_1At مواجه نیستند (۹). این مسأله فقط در مردان مشاهده شد و نشان می‌دهد که عوامل هورمونی در پیشرفت بیماری‌های کبدی در افراد دارای کاهش فعالیت α_1At مؤثر است (۲). از طرفی دلایلی وجود دارد که نشان می‌دهد نقص در سیستم α_1At به تنهایی باعث بیماری کبدی نمی‌شود (۱۰). همچنین شواهدی در دست است که مراحل پایانی بیماری کبدی با علل متعدد (نه فقط هپاتیت) با آلل فنوتیپ‌های α_1At در افراد هتروزیگوت مربوط است (۳).

در مطالعه‌ای که بر روی گروهی از بیماران انجام شده است و در آن درکنار تعیین فنوتیپ α_1At بیوپسی کبدی بیماران نیز انجام گرفته، شیوع فنوتیپ MZ در افراد مبتلا به هپاتیت مزمن فعال و سیروز بدون منشأ مشاهده شده است (۸). در حالی که در یک مطالعه دیگر انجام شده روی گروهی از افراد مبتلا به هپاتیت حاد یا مزمن، نقص α_1At در بیماران هتروزیگوت و افراد طبیعی تقریباً یکسان بود (۹). بنابراین با توجه به مقایسهٔ نتیجه چند تحقیق فوق نمی‌توان به تنهایی و بدون در نظر گرفتن عوامل دیگر ارتباطی قطعی بین بروز بیماری کبدی و افراد هتروزیگوت دارای کمبود α_1At پیشنهاد کرد و عواملی نظیر عفونت‌های ویروسی کبد، ناشی از ویروس هپاتیت B(HBV) یا ویروس هپاتیت C(HCV)، می‌بایست مد نظر قرار گیرد (۱۰). اریکسون (Eriksson) نیز در یک مقاله مروری در سال ۱۹۹۶ در مورد ارتباط فنوتیپ‌های α_1At و طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های کبد بحث کرده است (۷).

پراپست (Propst) و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی ۲۴۰ بیمار که مبتلا به سیروز با علل مختلف بوده‌اند تحقیق نمودند. از این ۲۴۰ بیمار، ۶۱ نفر مبتلا به نقص در سیستم α_1At بودند. در میان این گروه ۷۸ درصد یعنی ۱۷۹ مورد ابتلا به عفونت‌های ویروسی HCV یا HBV گزارش شد و ۳۶ نفر عفونت مزمن HCV همراه با سیروز داشتند. ۵۰ نفر یا قبلاً به HBV مبتلا بودند و یا هم‌اکنون به HBV مبتلا شده‌اند ولی همگی سیروزی بوده و ۲۴ نفر هم HBV و هم HCV داشتند. درصد فراوانی فنوتیپ افراد گروه سیروزی و افراد مبتلا به کمبود α_1At به قرار زیر گزارش گردید:

PiMZ ۸۳ درصد، PiSZ ۸ درصد، PiFZ ۷ درصد و PiZZ ۲ درصد. همین گروه، تحقیقاتی در سال ۱۹۹۴ بر روی ۱۶۳۱ بیمار کبدی انجام دادند که این بیماران به سه گروه تقسیم شدند: ۱۴۶۹ نفر بیماری کبدی داشتند ولی کمبود فعالیت α_1At نداشتند و فنوتیپ α_1At در همه آنها PiMM بود. در این گروه ۷ درصد آنتی HCV مثبت و ۵ درصد آنتی HBV مثبت داشتند. در گروه بعدی ۵۳ نفر مبتلا به سیروز بودند و ۱۲ نفر هپاتیت مزمن فعال داشتند ولی در همگی آنها کمبود α_1At وجود داشت. از میان ۵۳ نفر بیمار سیروزی ۸۱ درصد فنوتیپ PiMZ، ۶ درصد فنوتیپ PiSZ، ۹ درصد فنوتیپ PiFZ و ۴ درصد فنوتیپ PiZZ داشته و از ۱۲ نفر که دارای هپاتیپ مزمن بودند ۷۵ درصد فنوتیپ PiMZ، ۸/۳ درصد فنوتیپ PiFZ و ۸/۳ درصد PiZZ داشتند. در این گروه ۴۱ تا ۷۵ درصد بیماران قبلاً یا در زمان آزمایش مبتلا به HCV بودند (۱۰).

در مطالعه حاضر فنوتیپ‌های PiM1M2 و یا PiM1Z و PiM1S مشاهده شد که در جمعیت مورد مطالعه پراپست (۹,۱۱) گزارش نشده است. اما نتیجه مشترکی که از مقایسه دو بررسی حاصل می‌گردد آن است که اولاً فنوتیپ‌های هتروزیگوتی که شامل Z یا S باشند می‌توانند در بروز بیماری‌های کبدی دخالت داشته باشند و ثانیاً در تحقیقات مذکور در جامعه بیماران هیچ‌گونه فنوتیپ PiMM و یا PiM1M2 گزارش نشده است. این امر را می‌توان چنین توضیح داد که از آنجا که پراپست در تحقیقات خود تنها بیمارانی را که کمبود α_1At آنها ثابت شده بود بررسی نموده، لذا قابل پیش‌بینی است که فنوتیپ‌های طبیعی در آنها می‌بایست کمتر باشد در حالی که در مطالعهٔ حاضر آزمایش‌ها بر روی بیماران هپاتیتی مبتلا به HBV انجام شده است که این افراد می‌توانند بنا به هر دلیل دیگری با این ویروس آلوده شده باشند.

با توجه به نتایج حاصل از آزمون فیشر مشخص گردید که فنوتیپ‌های α_1At در افراد طبیعی و نیز افراد مبتلا به HBV

مختلف بوده و همچنین فنوتیپ‌های α_1At در افراد HBsAg مثبتی که مبتلا به سیروز می‌باشند با آن دسته از افراد HBsAg مثبتی که سیروزی نمی‌باشند متفاوت است. پیشنهاد می‌گردد تا آزمایش تعیین فنوتیپ‌ها برای تعداد بیشتری از افراد HBsAg مثبت انجام پذیرد تا بتوان نتایج را تعمیم داد. همچنین از نتایج کلی این بررسی چنین بر می‌آید که افراد دارای کمبود فعالیت α_1At چه در بقاء و تداوم بیماری و چه در توسعه آن مستعدتر از افراد طبیعی می‌باشند که فنوتیپ طبیعی دارند و علت آسیب سلول‌های کبدی شاید در اثر تجمع اشکال غیرطبیعی پروتئین Z یا α_1At در شبکه آندوپلاسمی سلول‌ها و یا نقص در سیستم آنتی پروتئاز باشد (۱،۵،۶،۸،۱۰،۱۲).

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد به ویژه آقایان دکتر ملک‌زاده ریاست محترم مرکز و دکتر علیزاده و نیز همکاران سازمان انتقال خون تهران به ویژه دکتر علویان صمیمانه قدردانی می‌نماید.

لازم به ذکر است این تحقیق به هزینه مشترک گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

Summary

The Comparison of α_1AT Phenotypes in Some HBsAg-Positive Patients with and without Cirrhosis in Tehran

A. Sahebghadam lotfi, PhD[1]; R. Malekzade, MD[2]; and B. Milani, MS[3]

1. Assistant Professor of Clinical Biochemistry, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

2. Professor of Internal Medicine, Tehran University of Medical Siences and Health Services, Tehran, Iran, 3. Master of Clinical Biochemistry

Alpha-1- antitrypsin is the most important serine protease inhibitor in serum. This protein has several phenotypes. Some of these phenotypes such as MZ, M, Z, M, S, MS, ZZ,... cause α_1AT deficiency which leads to damage in many tissues such as liver, lung, kidney. 60 patients and 28 healthy individuals (control group), aged 7-65 years old were studied for α_1AT activity and α_1AT phenotypes. The control group with HBsAg-negative were selected according to the physician confirmation and liver function tests. The test goup who were HBsAg-positive were devided into two groups: The first group without Cirrohosis and in the second group hepatic cirrhosis based on the pathological report was confirmed. In the control group the phenotype of P.MM was 100%, and in positive-HBs-Ag patients the prevalence of PiMM, PiM2 and PiMS were 80%, 11%, and 8.14% respectively. There were significant differences in the phenotypes among the three groups ($P<0.05$). Based on our results Patients with α_1AT deficiency infected with HBV are at the higher risk of cirrhosis than those with normal α_1AT phenotypes.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1999; 6(1): 17-22

Key Words: *Alpha-1-1antitrypsin, HAsAg, Iso electric focusing, Cirrhosis*

References

1. Cox DW, Alpha-1-antitripsin deficiency, Metabolic basis of inherited disease, Volume 11, 1994; Chapter 96: 2532-2568.
2. Crystal RG. Alpha-1- antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease, genetic basis and strategies for therapy, *the Journal of Clinical Investigation* 1990; 85(5): 1343-1352.
3. Eigenbrodt ML, Mc Cashland TM, DY RM. Clark J and Galati J. Heterozygous

α_1-antitrypsin phenotypes in pateints with end stage liver disease. *An J Castroenterol*, 1997; 92(4): 602-607.
4. Emanuel R and Faber JL (Eds). Esseritial pathology, Phyladelphia, J.B.Lippincott, 1995; 392-442.
5. Eriksson S. Liver disease in $\alpha_1$antitrypsin deficiency, scand. *J Gastroenterol*, 1985; 20: 907-911.
6. Eriksson S, Carlson J and Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in $\alpha_1$antitrypsin deficiency. *New Eng J Med*, 1986; 314(12): 736-739.
7. Eriksson S. A 30-year perspective on $\alpha_1$antirypsin deficiency. Chest 1996; 110(6): 237s-242s.
8. Fagerhol MK and Cox DW. The Pi polymorphism, genetic, biochemical and clinical aspects of human $\alpha_1$antitrypsin. Advances in Human Genetics, 1981; 11: 1-62.
9. Propst T, Propst A, Dietze O, Judmaier G, Braunsteiner H and Vogel W. High prevalance of viral infection in adults with homozygous and hetrozygous AATD and chronic liver disease. *Annals of Inter. Medicine* 1992; 117(8): 641-645.
10. Propst T, Propst A , Dietze O, Judmaier G, Braunsteiner H and Vogel W. Prevalance of hepatocellular carcinoma in alpha-1- antitrypsin deficiency. *Journal of Hepatology* 1994; 21(6): 1006-1011.
11. Propst A, Propst T, Ofner D, Feichtinger H, Judmaier G and Vogel W. Prognosis and life expectancy on α_1-antitrypsin deficiency and chronic liver disease. Scand *J Gastroenterol* 1995; 30(11): 1108-1112.
12. Rawlings W, Moss J, Cooper S and Hamilton SR. Hepatocellular carcinoma and partial deficiency of α_1-antitripsin (MZ). *Annals of Internal Medicine* 1974; 81: 771-773.
13. Smanadhikorn P, Pongpaew P, Srivatanakul P *et al.* α_1-antitrypsin phenotype piMZ, a risk factor for liver cirrhosis but not for liver cancers in Thailand. *Southeast-Asian J Trop Med Public Health*, 1995; 26(2): 240-242.