

Genetycznie uwarunkowane zaburzenia hemostazy w patogenezie udaru niedokrwiennego mózgu

Genetically determined disorders of haemostasis in the pathogenesis of ischemic stroke

Marta Nowak

STRESZCZENIE

Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej
Wydziału Lekarskiego w Katowicach
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

W warunkach fizjologicznych układ hemostazy pełni dwie podstawowe funkcje: zatrzymuje krwawienie przez tworzenie skrzepiny oraz utrzymuje płynność krwi poprzez rozpuszczenie skrzepu. Procesy krzepnięcia i fibrynolizy pozostają w stanie homeostazy i kontrolowane są przez odpowiednie aktywatory i inhibitory.

W licznych badaniach udowodniono istnienie związków między genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami krzepnięcia/fibrynolizy a zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego mózgu. Do zaburzeń tych należą niedobory inhibitorów krzepnięcia (AT, białek C i S, kofaktora heparyny II), a także uwarunkowane genetycznie wysokie stężenia białek układu krzepnięcia/fibrynolizy (fibrynogen, kompleksów trombina-antytrombina i inhibitora aktywatora plazminogenu) oraz mutacje/polimorfizmy genów kodujących elementy układu krzepnięcia (czynnika V, protrombiny, glikoprotein płytkowych). Klinicznie zaburzenia te należą do czynników ryzyka udaru niedokrwiennego mózgu i nasilają proces wykrzepiania, sprzyjając incydom zatorowo-zakrzepowym.

Obecnie szeroki dostęp do badań genetycznych, immunologicznych i biochemicznych umożliwia postawienie właściwej diagnozy przyczyn wystąpienia udaru mózgu. Stąd też przydatne w diagnostyce wydają się oznaczanie stężeń naturalnych antykoagulantów i fibrynogenu w osoczu oraz analiza genetyczna polimorfizmów i mutacji występujących w genach kodujących czynniki krzepnięcia/fibrynolizy. Wyniki analiz genetycznych mogą pozwolić określić fenotyp kliniczny choroby, co może być wykorzystane przy szacowaniu ryzyka wystąpienia udaru.

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Mgr Marta Nowak
Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej
Wydziału Lekarskiego w Katowicach
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Medyków 18
Katowice
tel. +48 880 300 404
e-mail: martakap@interia.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 4, 48–55
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

krzepnięcie, fibrynoliza, udar niedokrwienny mózgu, polimorfizm

ABSTRACT

In physiological conditions, the hemostasis system performs two basic functions: stops bleeding by forming blood clots and keeps the circulating blood flowing by dissolving the clot. The processes of coagulation and fibrinolysis in a state of homeostasis and are controlled by activators and inhibitors.

Numerous studies have demonstrated the existence of the relationship between genetically conditioned bleeding disorders/fibrinolysis and an increased risk of ischemic stroke. Among these disorders are the shortage of coagulation inhibitors (AT, protein C and S, heparin cofactor II) and genetically determined high levels of coagulation/fibrinolysis protein (fibrinogen, thrombin-anti-thrombin complexes and plasminogen activator inhibitor), as well as mutations/polymorphisms of genes encoding coagulation components (factor V, prothrombin, platelet glycoprotein). Clinically, these disorders are risk factors for ischemic stroke and intensify the process of coagulation, favoring embolic-thrombotic incidents.

Currently, the wide access to genetic, immunological and biochemical testing allows one to diagnose the causes of stroke. Hence, determination of the concentrations of natural anticoagulants and fibrinogen in plasma as well as the analysis of genetic polymorphisms and mutations occurring in genes encoding coagulation/fibrinolysis seem to be useful in the diagnosis. The results of genetic analysis may allow one to determine the clinical phenotype of the disease, which can be used in estimating the risk of stroke.

KEY WORDS

coagulation, fibrinolysis, ischemic stroke, polymorphism

WSPÓŁCZESNA TEORIA KRZEPNIĘCIA/FIBRYNOLIZY

W warunkach fizjologicznych układ hemostazy pełni dwie podstawowe funkcje: zatrzymuje krwawienie przez tworzenie skrzepiny oraz utrzymuje płynność krwi krążącej przez rozpuszczanie skrzepu. Zachowanie równowagi między układem krzepnięcia i fibrynolizy reguluje układ antykoagulacyjny. Współdziałanie tych trzech układów przedstawia współczesna teoria krzepnięcia krwi [1].

1. PROCES KRZEPNIĘCIA

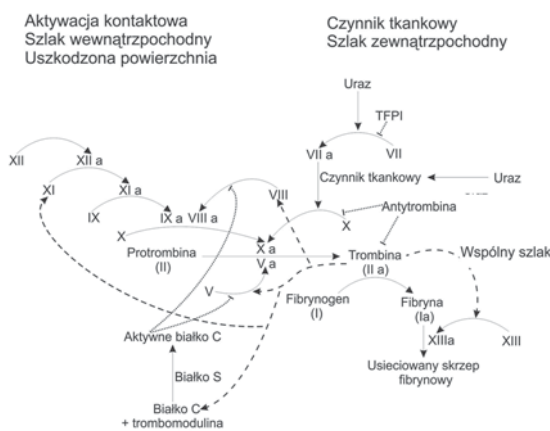
Proces krzepnięcia krwi zostaje zapoczątkowany przez przerwanie ciągłości łożyska naczyniowego i ma za zadanie zapobiec wynaczynieniu i utracie krwi. W miejscu uszkodzenia ściany naczynia dochodzi do ekspozycji kolagenu i agregacji płytek krwi. Wskutek tego powstaje czop płytkowy. Płytki krwi ulegają aktywacji i uwalniają szereg substancji czynnych z ziarnistości α oraz ziarnistości gęstych i lizosomalnych (ADP, serotonina, PF4). Ponadto aktywne płytki dostarczają fosfolipidów (fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanalamina) niezbędnych do tworzenia kompleksów tenazy, protrombinazy i aktywacji czynnika płytkowego 3 (PF3). Aktywacja płytek prowadzi także do uwolnienia czynnika V, pełniącego rolę receptora dla czyn-

nika X. W procesie krzepnięcia aktywne płytki uczestniczą wraz z kompleksem VIIa/TF (czynnik tkankowy) [2].

W rezultacie kaskady krzepnięcia aktywna forma czynnika X, tj. Xa, przy współdziałaniu czynnika Va, fosfolipidów powierzchniowych i jonów wapnia, tworzy kompleks zwany protrombinazą, przekształcający proteolitycznie protrombinę do trombiny. Z kolei trombina indukuje proteolityczne przekształcenie fibrynogenu w fibrynę, która tworzy sieć włókien, będących szkieletem skrzepu. Całość tych skomplikowanych procesów sprowadza się do aktywacji kolejnych czynników krzepnięcia krwi, co przypomina kaskadę. Kaskada taka ma jednak dwa odgałęzienia: drogę zewnątrz- i wewnątrzpochodną (ryc. 1). Z opisanym tu mechanizmem zewnątrzpochodnym mamy do czynienia, gdy krzepnięcie następuje po zetknięciu się krwi wypływającej z naczyń z uszkodzonymi tkankami, natomiast w mechanizmie wewnątrzpochodnym krew krzepnie w miejscu uszkodzonego śródbłonna naczyniowego.

Aktywację układu krzepnięcia w układzie wewnątrzpochodnym zapoczątkowują czynnik XII, prekalikreina, kininogen i czynnik XI w obecności trombiny. Aktywny czynnik XIa

aktywuje czynnik IX, a ten w obecności czynnika VIIIa, fosfolipidów i jonów wapnia aktywuje czynnik X, doprowadzając do rozkładu protrombiny do trombiny. Wspólnym etapem zachodzącym w obu szlakach jest utworzenie z protrombiny aktywnego enzymu – trombiny, który działa bezpośrednio na fibrynogen. Kiedy skrzep spełni już swoją rolę, podlega fibrylizacji pod wpływem plazminy – enzymu powstającego z plazminogenu. Proces powstania i aktywacji plazminy również przebiega kaskadowo. Te dwa procesy: krzepnięcie i fibrylizacja pozostają w stanie homeostazy [3].



Ryc. 1. Schemat regulacji procesu krzepnięcia krwi (TFPI – inhibitor szlaku zależnego od czynnika tkankowego).

Fig. 1. Regulatory scheme of coagulation process.

Krzepnięcie krwi kontrolowane jest przez wiele aktywatorów i inhibitorów (ryc. 1). Poznano ich budowę i działanie. Do najważniejszych inhibitorów krzepnięcia należą: antytrombina, TFPI – inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia, kofaktor heparyny II, ZPI – inhibitor krzepnięcia zależny od białka Z, układ białka C (białko C, białko S, trombomodulina), $\alpha 1$ – antytrypsyna, $\alpha 2$ – makroglobulina, inhibitor C1-esterazy.

Inhibitory naturalne o nie do końca znanym udziale to: aneksyna V, neksyny proteazowe, lipokortyny, aptamery, TAP (Tic Anticoagulant Peptide) [2]. Do aktywatorów krzepnięcia należą: czynnik von Willebranda (vWF), czynnik V i VIII, trombospodyna (TSP), tromboksan A2, czynnik tkankowy TF, fibrynogen, czynnik aktywujący płytki (PAF) oraz czynnik martwiczy nowotworu (TNF α) [4]. Do najważniejszych inhibitorów fibrylizacji należą: inhibitory tkankowego aktywatora plazminogenu PAI-1 i

PAI-2 oraz $\alpha 2$ -antypłazmina. TAFI – inhibitor fibrylizacji aktywowany trombiną [4,2]. Aktywatory fibrylizacji: endogenne t-PA (tkankowy aktywator plazminogenu) i u-PA (urokinazowy aktywator plazminogenu), egzogenne produkowane przez bakterie (paciorkowce, gronkowce) i syntetyczne [2].

Śród wymienionych inhibitorów krzepnięcia największe spektrum działania ma antytrombina (AT), dawniej antytrombina III (ATIII). Białko to jest glikoproteiną, syntetyzowaną głównie w wątrobie, ale również w komórkach śródbłonna naczyń, megakariocytach i płytkach krwi. Antytrombina inaktywuje aktywny czynnik krzepnięcia IIa (trombinę) poprzez tworzenie kompleksu, który zostaje usunięty z krwi przez makrofagi. Wydajność tego procesu 1000-krotnie wzrasta pod wpływem heparyny. Antytrombina jest uważana za najważniejszy fizjologiczny inhibitor trombiny, a jej aktywność stanowi 50–80% aktywności antytrombinowej osocza. Antytrombina inaktywuje również czynniki krzepnięcia: IXa, Xa, XIa i XIIa oraz VIIa w obecności heparyny, a także hamuje fibrylizację przez blokowanie plazminy [5,2].

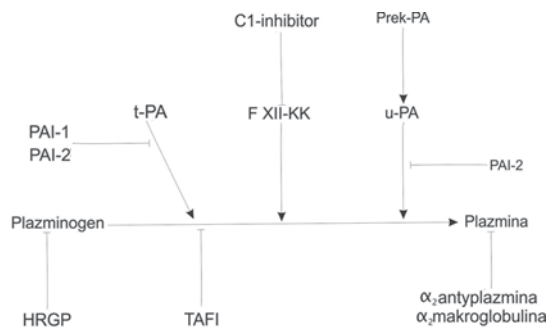
Podobne działanie do AT wykazuje kofaktor heparyny II (glikoproteina syntetyzowana w wątrobie), który również wiąże i inaktywuje trombinę, a proces ten nasila się pod wpływem heparyny [4].

Do układów inhibitorowych, hamujących krzepnięcie krwi, działających na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, należy układ antykoagulacyjny białka C. W jego skład wchodzi trombomodulina oraz białka C i S. Działanie tego układu inicjowane jest przez trombinę przyłączoną do związanej ze śródbłonkiem trombomoduliny. Trombomodulina ma zdolność zmieniania funkcji trombiny. Trombina jest centralnym enzymem regulacyjnym w homeostazie. Enzym ten po związaniu z trombomoduliną nabywa zdolności aktywowania białka C. Proces ten zachodzi 1000 razy szybciej dzięki kompleksowi trombina–trombomodulina. Aktywne białko C (APC) w obecności kofaktora – białka S, degradowuje i inaktywuje aktywne czynniki: V i VIII. Białko C jest zależną od witaminy K glikoproteiną, syntetyzowaną przez wątrobę. Układ białka C hamuje proces krzepnięcia krwi, inaktywując czynniki Va i VIIIa. Jednocześnie białko C aktywuje proces fibrylizacji poprzez inaktywację inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1) [4,5].

Proces krzepnięcia krwi na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, a także bezpośrednio hamuje inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia TFPI, który jest syntetyzowany w wątrobie oraz przez komórki śródbłonna, megakariocyty i makrofagi. Inaktywuje on bezpośrednio czynnik tkankowy (TF występujący w kompleksie z czynnikiem VIIa) i czynnik Xa, wytwarzając nieaktywny kompleks. Kompleks czynnika VIIa z TF aktywuje czynnik X, który z kolei łączy się z TFPI i w ten sposób hamuje aktywność kompleksu czynnika VIIa z TF na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego [1, 4].

2. PROCES FIBRYNOLIZY

Krzepnięciu krwi przeciwdziałają w naturalny sposób fibrynoliza. Proces fibrynolizy ma na celu rozpuszczenie wewnątrznaczyniowych złogów włókniaka i utrzymanie drożności naczyń, jednak niekontrolowany może doprowadzić do obniżenia krzepliwości krwi i powstania krwotoku. Dlatego też układ fibrynolizy kontrolowany jest na poszczególnych etapach przez szereg inhibitorów i aktywatorów (ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat regulacji procesu fibrynolizy: C1-inhibitor – inhibitor dla składowej C1 układu dopełniacza, FXII-KK – czynnik XII w kompleksie z kalikreina, HRGP – glikoproteina bogata w histydynę, PAI – inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu, prek-PA – prekursor aktywatora plazminogenu, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, u-PA – urokinazowy aktywator plazminogenu, TAFI – trombinozależny inhibitor fibrynolizy.

Fig. 2. Regulatory scheme of of fibrinolysis process.

W skład układu fibrynolitycznego wchodzi proenzym – plazminogen, aktywowany do plazminy przez tor wewnątrzpochodny (czynnik XIIa, kininogen, kalikreina) lub zewnątrzpochodny (aktywator tkankowy t-PA i urokinazowy u-PA). W początkowym etapie reakcji na nieaktywny plazminogen działa inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę (TAFI), ograniczając fibrynolizę. Zmniejsza on

zdolność wiązania plazminy do fibrynogeny poprzez usuwanie reszt lizynowych z C-końca częściowo zdegradowanej fibryny. Aktywatory plazminogenu t-PA i u-PA są hamowane przez odpowiednie inhibitory PAI-1 i PAI-2. Sprawne działanie układu fibrynolizy uwarunkowane jest równowagą między poziomem tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1). Zmniejszone uwalnianie t-PA lub wzrost poziomu PAI-1 powoduje osłabienie fibrynolizy [6]. Inhibitor PAI-1 syntetyzowany jest przez komórki śródbłonna naczyniowego, komórki wątroby i megakariocyty. Jego syntezę promują: trombina, transformujący czynnik wzrostu, płytkowy czynnik wzrostu, interleukina-1 i 6, insulinopodobny czynnik wzrostu, glikokortykoidy, endotoksyna, natomiast aktywne białko C obniża jego ekspresję [7].

ZABURZENIA HEMOSTAZY A UDAR NIEDOKRWIENNY MÓZGU

Liczne badania wykazały zaburzenia procesów krzepnięcia i fibrynolizy w patogenezie udaru niedokrwiennego mózgu. Udar niedokrwienny stanowi aż 80% wszystkich udarów mózgu. Jest on spowodowany ogniskowym zamknięciem światła naczynia, co prowadzi do przerwania dopływu tlenu i glukozy do mózgu, z następowym zaburzeniem procesów metabolicznych w dotkniętym obszarze [8]. Wrodzone i nabyte zaburzenia hemostazy są jedną z wielu poznanych przyczyn udaru. Coraz więcej uwagi poświęca się roli płytek krwi, fibrynogeny, AT, białek C i S oraz protrombiny po incydentach niedokrwiennych mózgu. Oznaczanie tych parametrów we krwi może być pomocne w ustalaniu przyczyny udarów niedokrwiennych o niejasnej etiologii, zwłaszcza u osób młodych i w średnim wieku.

Badania roli **aktywacji płytek krwi** w udarze niedokrwiennym mózgu dotyczą zaburzeń hemostazy, wynikających ze zwiększonej aktywności i agregacji płytek krwi. W odpowiedzi na uszkodzenie ściany naczynia dochodzi do pobudzenia płytek krwi, które mają zdolność przylegania do śródbłonna naczyniowego za pomocą swoistych receptorów powierzchniowych (glikoprotein błonowych-GP). Zwiększona aktywność i agregacja trombocytów towarzyszy ostrym stanom niedokrwiennym i prowadzi do powstania zatorów/zakrzepów. Stwierdzono, iż najczęstszym badanym markerem ich aktywacji jest poziom β -tromboglobuliny (β -TG) i czynnika płytkowego PF-4. Rola

platek krwi w udarze niedokrwiennym nie ogranicza się tylko do ich funkcji prokoagulatoryjnej. Zarówno same płytki, jak i mediatory uwalniane w trakcie ich aktywacji, pełnią rolę mitogenów, stymulujących wzrost, proliferację i migrację miocytów do warstwy podśródbłonkowej naczynia, warunkując rozrost i przebudowę ściany naczyniowej. Zwrócono także uwagę na nadmierną aktywację płytek przed epizodem niedokrwiennym, co w świetle omówionych danych stanowi ryzyko udaru [9].

Istnieje związek między podwyższonym osoczym **stężeniem fibrynogenu** (fibrinogenemia) a udarem niedokrwiennym mózgu. Fibrynogen jest czynnikiem patogenetycznym, a nie tylko wskaźnikiem ryzyka udaru. Wzrost stężenia fibrynogenu jest zależny nie tylko od jego przyspieszonej produkcji, ale też od zwolnionej degradacji. Zwiększona produkcja następuje w reakcji ostrej fazy, po uszkodzeniu śródbłonka oraz często wskutek aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy. Podwyższone stężenie fibrynogenu utrzymuje się przez kilkanaście miesięcy po udarze, przypuszczalnie jako wskaźnik przewlekłej reakcji zapalnej [10].

Podobnie do fibrynogenu zachowują się inne prozakrzepowe składniki układu krzepnięcia. Wraz ze wzrostem stężenia fibrynogenu wzrasta w udarze **stężenie czynników VII i VIII, następuje niedobór antytrombiny i aktywnego białka C**. Jak już wspomniano, zostają także uwolnione substancje aktywujące płytki i inicjujące trombinogenezę. Ponadto stwierdzono związane ze wzrostem PAI-1 zahamowanie aktywności fibrynolitycznej, zarówno przed udarem, jak i podczas jego trwania. Wynika z tego, że podwyższone stężenie fibrynogenu może pośrednio wskazywać na zaburzenia w całej grupie czynników hemostazy, co dodatkowo zwiększa ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu [10].

U chorych z ostrym niedokrwieniem ośrodkowego układu nerwowego stwierdza się obniżenie **aktywności białka S** oraz C, a także AT na skutek zużycia w procesie tworzenia zakrzepu. Białko S jest jednołańcuchową glikoproteiną, zależną od witaminy K jako kofaktora. Przeciwzakrzepowe działanie aktywnego białka C wynika z promowania inaktywacji czynników Va i VIIa, jak również bezpośredniego hamowania aktywacji protrombiny i stymulowania fibrynolizy.

W surowicy białko S występuje w dwóch postaciach: wolnej oraz związanej z białkiem wią-

żącym C4. Wyróżnia się trzy typy niedoboru białka S. Typ I obejmuje około 50% niedobór białka S całkowitego, znaczny niedobór białka wolnego i zmniejszoną aktywność białka S. W typie II stężenie białka S całkowitego i wolnego jest prawidłowe, występuje natomiast zmniejszona aktywność białka S. Typ III charakteryzuje się zmniejszoną aktywnością białka S, przy prawidłowym stężeniu białka całkowitego i obniżonym wolnego białka S. Niedobór białka S może być dziedziczny (autosomalnie dominująco) oraz nabyty. Przyczyną nabytego niedoboru białka S mogą być choroby wątroby, rozsiane krzepnięcie śródnacyniowe, zespół nerczycowy, toczeń układowy i inne [11].

Białko C jest syntetyzowane w wątrobie w formie nieaktywnej, jednołańcuchowej glikoproteiny. Aktywna, dwułańcuchowa postać tego białka powstaje w obrębie śródbłonka naczyniowego przy udziale kompleksu trombina-trombomodulina. Aktywna forma białka C przy udziale kofaktora, jakim jest białko S, wykazuje działanie przeciwzakrzepowe przez inaktywację czynników Va i VIIa, a ponadto aktywuje fibrynolizę przez neutralizację PAI-1. Istnieją dwa typy deficytu tego białka: I – z obniżeniem aktywności oraz stężenia w takim samym stopniu (defekt ilościowy), II – aktywność jest mniejsza niż stężenie, co jest spowodowane produkcją nieprawidłowej cząsteczki białka C (defekt jakościowy) [12].

Antytrombina jest jednołańcuchową glikoproteiną należącą do inhibitorów proteaz. Bierze udział w regulacji hemostazy poprzez hamowanie aktywności trombiny oraz czynników krzepnięcia VIIa, IXa, XIa, XIIa. W populacji ogólnej jej klinicznie jawny deficyt występuje z częstością 1 : 2000–5000. Opisano dwa rodzaje deficytu AT. W pierwszym zarówno aktywność, jak i stężenie są obniżone w jednakowym stopniu (defekt ilościowy), w drugim zaś stężenie jest wyższe niż jego aktywność, co wskazuje na zaburzenie funkcji tego białka (defekt jakościowy) [12].

Poglądy na temat niedoboru wymienionych fizjologicznych inhibitorów krzepnięcia nie są jednoznaczne. De Lucia i wsp., badając 50 młodych pacjentów z objawami przemijającego niedokrwienia mózgu, zauważyli, że przy prawidłowym stanie naczyń wewnętrznych i zewnętrznych występował u nich niedobór białek S, C lub AT oraz ich obniżona aktywność. Spośród 34 chorych z udarem niedokrwiennym mózgu ocenianych przez Anzola i wsp., u 18,4% stwierdzono niedobór wolnego

białka S, zaś u 14% obniżenie stężenia białka C w surowicy. Wśród 120 młodych pacjentów z ostrym udarem mózgu badanych przez Muntsa i wsp., ponad 20% miało nieprawidłowe stężenia fizjologicznych inhibitorów krzepnięcia w surowicy (w tym u 20 chorych występował niedobór białka S). Wyniki wymienionych badań sugerują, że idiopatyczne zaburzenie koagulacji stwierdza się u około 25% młodych osób z udarem, dlatego powinno się ich poddawać badaniu naturalnych antykoagulantów [13]. Niektórzy autorzy są zdania, że zaburzenia układu krzepnięcia nie wiążą się z występowaniem udarów niedokrwiennych mózgu u osób w młodym wieku, a dziedziczny niedobór naturalnych antykoagulantów jest bardzo rzadko spotykany, w związku z czym tego typu badania są mało przydatne [11,14,15].

GENETYCZNE PODŁOŻE ZABURZEŃ KRZEPNIĘCIA/FIBRYNOLIZY

W licznych badaniach udowodniono związki między genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami krzepnięcia a zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego mózgu. Do zaburzeń tych należą niedobory inhibitorów krzepnięcia (AT, białek C i S, kofaktora heparyny II) oraz uwarunkowane genetycznie wysokie stężenia białek układu krzepnięcia/fibrinolizy (fibrinogenu, kompleksów trombina–antytrombina i inhibitora aktywatora plazminogenu, czynnika von Willebranda), a także mutacje/polimorfizmy genów kodujących elementy układu krzepnięcia (czynnika V, protrombiny, glikoprotein płytkowych). Klinicznie zaburzenia te związane są z zakrzepicą, prowadzącą do powstania udaru niedokrwiennego mózgu [4,16].

Stężenia poszczególnych białek uczestniczących w hemostazie, tj. fibrinogenu, ATIII, białka C i S różnią się znacząco u poszczególnych osób. Uważa się, że w dużej mierze jest to uwarunkowane genetycznie. Udowodniono m.in., że poziom **fibrinogenu** w surowicy dzieci z chorobą naczyniową mózgu w wywiadzie rodzinnym jest wyższy niż u dzieci z nieobciążonym wywiadem rodzinnym. Częsteczka fibrinogenu jest dimerem, obie podjednostki składają się z łańcuchów polipeptydowych α , β i γ , kodowanych odpowiednio przez geny *FGA*, *FGB*, *FGG*, zlokalizowane na chromosomie 4 (4q31.3) [17, 18]. Monomery połączone są wiązaniami dwusiarczkowymi. U człowieka w obrębie genu dla łańcucha β fibrinogenu, w regionie promotorowym opi-

sano polimorfizmy –455G/A (rs1800790) oraz –148C/T (rs1800787) [12]. Badania kliniczno-kontrolne wykazały zwiększony poziom łańcucha β fibrinogenu u osób z genotypem AA w polimorfizmie –455G/A i genotypem TT w polimorfizmie –148C/T. Homozygotyczność w obrębie obu polimorfizmów sprzyja hiperfibrinogenemii oraz zwiększa agregację płytek krwi i lepkość krwi. U osób z genotypem –455G/G zaobserwowano znacznie niższy poziom fibrinogenu w osoczu niż u osób o genotypach G/A i A/A [17, 19]. Według niektórych źródeł, genotypy G/A i A/A wiążą się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu [19]. Nieliczne badania prowadzone nad łańcuchem γ fibrinogenu wykazały duże znaczenie stosunku łańcucha γ fibrinogenu do całkowitego fibrinogenu w udarze niedokrwiennym mózgu. W badaniach tych stwierdzono, że stosunek ten był wyższy u pacjentów podczas ostrej fazy udaru niż u osób z grupy kontrolnej oraz niższy w fazie rekonwalescencji u pacjentów 3 miesiące po udarze. Wykazano także związek haplotypu H3 fibrinogenu γ ze zmniejszonym ryzykiem udaru i działaniem ochronnym przed udarem [20].

Stwierdzono, że deficyty białek C, S i AT są dziedziczne autosomalnie dominująco. U homozygotycznych noworodków niedobór białka C jest przyczyną zgonów, u heterozygot zaś stanowi istotny czynnik ryzyka zakrzepicy naczyń OUN oraz udaru niedokrwiennego u dzieci. Deficyt białek S i AT przyczynia się do występowania zakrzepicy naczyń mózgowych [20]. Wykryto dwa geny kodujące **białko S** na chromosomie 3 (3q11.1-q11.2): gen aktywny – *PROS1* oraz pseudogen S *PROS2* (w 97% homologiczny z genem aktywnym).

Najczęstszymi wadami genetycznymi w genie białka S są mutacje punktowe, dominujące u osób heterozygotycznych. Bardzo rzadko występują w formie homozygotycznej. W genie *PROS1* zidentyfikowano polimorfizmy: C/T w intronie K (rs8178649), A/G w egzonie 626 (rs6123) oraz C/A zlokalizowany 520 par zasad poniżej kodonu stop (rs9681204). Niedobór białka S jest obecny u 2% chorych z chorobą zatorowo-zakrzepową. U osób zdrowych 40% całkowitego białka S występuje w stanie wolnym i w takiej formie pełni funkcje kofaktora białka C, a 60% jest w stanie związanym z białkiem C4b [21].

W przeciwieństwie do białka S, wiele mutacji w obrębie genu kodującego **białko C** prze-

biega bezobjawowo. Gen kodujący białko C (*PROC*) zlokalizowany jest na chromosomie 2 (2q14.3). Niedobór białka C dziedziczony jest autosomalnie dominująco i wiąże się z wysokim ryzykiem zakrzepicy żyłnej. Polimorfizmy genotypu regionu promotorowego genu kodującego białko C (-153C/T, -140A/G, +26A/T) wpływają na fenotyp kliniczny [22]. Średni poziom aktywności białka C u homozygot o genotypie C/G/T jest o 22% mniejszy niż u homozygot o genotypie T/A/A. Zgodnie z tym osoby z niedoborem białka C o genotypie C/G/T wykazują większe ryzyko zakrzepicy żyłnej niż o genotypie T/A/A [22]. Niedobór białka C jest obecny u 7% młodych pacjentów z żylną chorobą zatorowo-zakrzepową i udarem niedokrwiennym mózgu [23].

W przeciwieństwie do białek S i C, niedobór AT występuje bardzo rzadko (w ogólnej populacji 0,2–0,4%). U homozygot niedobór AT prowadzi zawsze do stanów zakrzepowych. Obniżenie poziomu aktywności AT o 50% sprzyja rozwojowi zakrzepicy. Gen dla AT znajduje się na chromosomie 1 (1q23.1–q23.9), a mutacje w obrębie tego genu to mutacje punktowe lub delecje [21].

Powszechnie występująca mutacja punktowa Leiden (częstość w populacji 2–7%) w obrębie genu kodującego czynnik V na chromosomie 1 (1q24.2) w 90% przypadków jest przyczyną oporności na proteolityczne działanie aktywnej postaci białka C (APCR – *activated protein C resistance*). Osoby z mutacją typu Leiden posiadają białkowy czynnik V niewrażliwy na inaktywację przy udziale białka C, co prowadzi do podwyższonej aktywności czynnika V. Mutacja ta jest dziedziczona autosomalnie dominująco i prowadzi do zamiany argininy na glutaminę w pozycji 506 łańcucha białkowego (R506Q, rs6025). Wynikiem tej mutacji jest podwyższony poziom trombiny we krwi, który zwiększa 5-krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu u homozygot [24], a u heterozygot 7-krotnie [23]. Stwierdzono, że obecność haplotypu HR2 genu kodującego czynnik V jest łagodnym czynnikiem ryzyka zakrzepicy [24].

Drugą co do częstości występowania mutacją punktową (częstość w populacji 1–2%) jest tranzycja guaniny do adeniny G20210A w obrębie końca 3', regionu niekodującego białka genu **protrombiny G20210A** (rs1799963). Gen dla czynnika II znajduje się na chromosomie 11 (11p11.2). Na skutek mutacji u heterozygot/homozygot dochodzi do wzrostu

stężenia protrombiny w osoczu średnio 130% powyżej zakresu prawidłowego [25], co zwiększa 3-krotnie ryzyko wystąpienia zakrzepicy i udaru mózgu [23].

Polimorfizm **genu PAI-1** wydaje się mieć znaczący wpływ na ryzyko chorób naczyniowych, w tym udaru niedokrwiennego mózgu. Gen dla PAI-1 zlokalizowany jest na chromosomie 7 (7q21.3–q22). Znane są dwa polimorfizmy w obrębie genu *PAI-1*: 844G/A, 6754G/5G. Badania nad haplotypem A-G-4G wykazały zwiększone ryzyko udaru mózgu, spowodowanego chorobą małych naczyń [26]. Polimorfizm insercyjno/delecyjny 4G/5G (rs1799768) w regionie promotorowym w pozycji 675 genu *PAI* wpływa na poziom PAI-1 w osoczu. Allel 4G jest ściśle związany z wysokim stężeniem tego białka [24], allel 5G z niższym, natomiast heterozygoty 4G/5G charakteryzuje pośrednia wartość stężenia PAI-1.

Zwiększony osoczowy poziom PAI-1, obserwowany w zespole wykrzepiania śródnaczyniowego, może świadczyć o upośledzeniu fibrynolizy i stanowi zły wskaźnik prognostyczny, natomiast obniżony poziom PAI-1 lub jego niedobór u osobników homozygotycznych zwiększa ryzyko krwawień [3]. Pojedyncza kopia genu jest wystarczająca do zapewnienia ilości białka niezbędnej do prawidłowej hemostazy [7], ponieważ u heterozygot nie obserwuje się objawów skazy krwotocznej. Zaobserwowano ochronne działanie genotypu 4G/4G *PAI-1* z uwagi na szczególnie niskie ryzyko zachorowalności na udar mózgu u homozygot z allelem 4G. Genotyp 4G/4G charakteryzuje się wysoką ekspresją w astrocytach, ale nie wewnątrz naczyń w porównaniu z genotypem 5G/5G [27].

Znane są polimorfizmy w obrębie genów kodujących **receptory powierzchniowe płytek krwi – glikoprotein**. Ich rola jako czynnika ryzyka chorób naczyniowych nie została do końca jeszcze wyjaśniona, ale w dużym stopniu modyfikują one reaktywność płytek krwi. W ostrych stanach niedokrwiennych, na skutek połączenia receptorów płytkowych z odpowiednimi ligandami, dochodzi do zwiększonej aktywności i agregacji płytek. Znane są polimorfizmy glikoproteiny GPIIb (rs224309, rs6065) -5T/C, T145M, VNTR, glikoproteiny GPIIb (rs5918) V837M, S841I, glikoproteiny GPIa T807C, A873G. Stwierdzono pozytywną korelację między zwiększoną gęstością glikoproteiny na powierzchni płytki GPIa, wynika-

jąca z obecności allele 1, a wystąpieniem udaru mózgu [9].

PODSUMOWANIE

Liczne badania prowadzone nad genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami białek układu hemostazy potwierdzają ich związek z udarem niedokrwiennym mózgu. Opisane tu niedobory białek C i S, antytrombiny, wysokie stężenie fibrynogenu, mutacje i polimorfizmy genów kodujących czynniki krzepnięcia oraz białka układu fibrynolizy należą do czynników ryzy-

ka udaru niedokrwiennego mózgu. Wszystkie te czynniki nasilają proces wykrzepiania, sprzyjając incydom zatorowo-zakrzepowym. Obecnie szeroki dostęp do badań genetycznych, immunologicznych i biochemicznych umożliwia postawienie właściwej diagnozy przyczyn wystąpienia udaru mózgu. Stąd też przydatne w diagnostyce wydaje się oznaczanie stężeń naturalnych antykoagulantów i fibrynogenu w osoczu oraz genotypowanie czynników krzepnięcia/fibrynolizy. Wyniki analiz genetycznych często pozwalają na ustalenie fenotypu klinicznego choroby, wówczas genotyp przekłada się na fenotyp, co jest wykorzystywane przy określaniu wielkości ryzyka udaru.

PIŚMIENNICTWO

- Radziwon P., Kłoczko J., Kiss B. Współczesna teoria aktywacji i kontroli krzepnięcia krwi. *Prz. Lek.* 2004; 11: 50–56.
- Raszeja-Szpecht A., Kabata J. Praktyczne aspekty koagulologii. *Bio-Ksel Sp. z o.o., Grudziądz* 2001, 9–12, 23–34.
- Sawicka B. Przeciwzakrzepowe i prozakrzepowe działanie układu hemostazy. *Bio-Ksel Sp. z o.o., Grudziądz* 2004, 13–16.
- Jastrzębska M. Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie. *Ośrodek Informacji Naukowej OINPHARMA Sp. z o.o., Warszawa* 2009, 75–88.
- Wyględowska G. Rola endogennych inhibitorów układu krzepnięcia: antytrombiny III, białka C, białka S w układzie hemostazy. *Nowa Pediatr.* 2001; 4: 30–32.
- Abdullah W. Z., Idris S. Z., Bashkar S., Hassan R. Role of fibrinolytic markers in acute stroke. *Singapore Med. J.* 2009; 50: 604–609.
- Młynarska A., Waszyrowski T. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 w patogenezie zaburzeń naczyniowych. *Forum Kardiol.* 2000; 2: 50–54.
- Błaszczak B., Czernecki R., Prędotka-Panicka H. Profilaktyka pierwotna i wtórna udarów mózgu. *Studia Medyczne* 2008; 9: 71–75.
- Łukasik M. Płytki krwi a udar niedokrwienny mózgu. *Aktual. Neurol.* 2001; 2: 26–31.
- Bajer-Czajkowska A., Nowacki P., Nocoń D., Podbielski J. Fibrynogen osoczowy a dynamika ostrej fazy udaru niedokrwiennego mózgu. *Udar Mózgu* 2002; 4: 47–51.
- Kazibutowska Z., Motta E., Gołba A., Stelmach-Wawrzyczek M., Rogoż B. Dwukrotny zawał niedokrwienny mózgu u chorego z pierwotnym zespołem antyfosfolipidowym i niedoborem białka S. *Udar Mózgu* 2003; 5: 31–36.
- Kopyta I., Marszał E. Czynniki ryzyka udaru mózgu u dzieci. *Udar Mózgu* 2004; 6: 47–55.
- De Lucia D., Renis V., Belli A. i wsp. Familial coagulation-inhibiting and fibrinolytic protein deficiencies in juvenile transient ischemic attacks. *J. Neurosurg. Sci.* 1996; 40: 25–35.
- Amiri M., Schmidley J.W., Fink L.M., Nazarian S.M. Is testing for inherited coagulation inhibitor deficiencies in young stroke patients worthwhile? *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2000; 102: 219–222.
- Douay X., Lucas C., Caron C., Goudernand J., Leys D. Antithrombin protein C and protein S levels in 127 consecutive young adults with ischemic stroke. *Acta Neurol. Scand.* 1998; 98: 124–127.
- Iskra T., Turaj W., Słowik A., Zwolińska G., Strojny J., Szczudlik A. Hemostatyczne wskaźniki uszkodzenia śródbłonna w udarze niedokrwiennym spowodowanym chorobą dużych lub małych naczyń. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2006; 125: 429–433.
- Siegerink B., Rosendaal F. R., Algra A. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7: 385–390.
- Częstochowska E., Sworczak K. Hematologiczne aspekty udarów mózgu. *Udar Mózgu* 2006; 8: 28–32.
- Xu X., Li J., Sheng W., Liu L. Meta-Analysis of genetic studies from journals published in China of ischemic stroke in the Han Chinese Population. *Cerebrovasc. Dis.* 2008; 26: 48–62.
- Cheung E. Y., Uitte de Willige S., Vos H. L., Leebeek F. W., Dippel D. W., Bertina R. M., de Maat M., P. Fibrinogen gamma in ischemic stroke: a case-control study. *Stroke* 2008; 39: 1033–1035.
- Beauchamp N. J., Dykes A. C., Parikh N., Tait R. C., Daly M. E. The prevalence of, and molecular defects underlying, inherited protein S deficiency in the general population. *Brit. J. Haemat.* 2004; 125: 647–654.
- Millar D.S., Johansen B., Berntorp E. i wsp. Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum. Genet.* 2000; 106: 646–653.
- Boekholdt S. M., Kramer M.H. Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007; 33: 588–596.
- Tsantes A. E., Nikolopoulos G. K., Bagos P.G., Bonovas S., Kopterides P., Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-PAI 1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb. Res.* 2008; 122: 736–742.
- Green D. Thrombophilia and stroke. *Top Stroke Rehabil.* 2003; 10: 21–33.
- Adamski M. G., Turaj W., Słowik A., Wloch-Kopec D., Wolkow P., Szczudlik A. A-G-4 G haplotype of PAI-1 gene polymorphisms 844 G/A, Hind III G/C and 675 4G/5G is associated with increased of ischemic stroke caused by small vessel disease. *Acta Neurol. Scand.* 2009; 120: 94–100.
- Jood K., Ladenvall P., Tjarnlund-Wolf A. i wsp. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 2077–2081.