

Polimorfizmy genów związanych z krzepnięciem krwi a udar niedokrwienny mózgu u dzieci – pilotowe badania rodzin

Polymorphisms of genes encoding coagulation factors and brain ischemic stroke in children – pilot study of families

¹Iwona Żak, ²Ilona Kopyta, ²Ewa Emich-Widera, ¹Beata Sarecka, ¹Anna Balcerzyk, ¹Paweł Niemiec, ²Elżbieta Marszał

¹Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

²Klinika Neurologii Wieku Rozwojowego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

STRESZCZENIE

Cel pracy. Analiza związku polimorfizmów: -455G>A fibrynogenu β (*FGB*), 1691G>A genu czynnika V oraz 20210G>A genu protrombiny z przebyciem w dzieciństwie udarem niedokrwiennym mózgu, z uwzględnieniem trwałych następstw neurologicznych po przebyciu udaru. **Materiał i metody.** Badaniami objęto 111 białych osób rasy kaukaskiej, w tym: dzieci po udarze niedokrwiennym mózgu ($n=17$), ich rodziców ($n=33$), osoby zdrowe do 20 roku życia ($n=18$) oraz krwiodawców w wieku 21–40 lat bez obciążeń rodzinnymi chorobami sercowo-naczyniowymi w ankiecie ($n=43$). Wszystkie badane polimorfizmy genotypowano przy użyciu techniki PCR-RFLP. Uzyskane wyniki analizowano za pomocą programów *Statistica 6.0* oraz *EpilInfo*. **Wyniki.** Stwierdzono istotnie wyższy poziom cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL ($p=0,034$ i $p=0,001$) w całej grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną w wieku do 20 lat. Poziom cholesterolu LDL był wyższy wśród pacjentów w stanie klinicznym dość dobrym w porównaniu z młodszą kontrolą ($p=0,03$). W grupach pacjentów, dzieci zdrowych i krwiodawców zaobserwowano tendencję do występowania wyższego poziomu fibrynogenu wśród nosicieli allelu A (genotypy AA i GA) w porównaniu ze stężeniem u osób z genotypem GG. Częstość homozygot AA genu *FGB* była najwyższa (jednak nieznamienne) w grupie dzieci po udarze w stanie klinicznym dość dobrym w porównaniu z grupą kontrolną do 20 roku życia (17% vs 6%). Częstość występowania heterozygot GA w grupie dzieci po udarze była niższa w porównaniu z dziećmi zdrowymi (47% vs 61%). W grupie dzieci po udarze nie stwierdzono obecności alleli mutacyjnych zarówno w genie czynnika V, jak i w genie protrombiny.

Słowa kluczowe: udar niedokrwienny mózgu, fibrynogen beta, czynnik II, czynnik V, polimorfizm

ABSTRACT

Aim. Analysis of association between -455G>A polymorphism of the *FGB* gene, 1691G>A polymorphism of factor V gene and 20210G>A polymorphism of prothrombin gene and brain ischemic stroke in children, considering the stroke consequences of the patients. **Material and method.** The population analyzed in the study consisted of 111 white Polish Caucasians, including: children with brain ischemic stroke (patients' group, $n=17$), their parents ($n=33$), healthy subjects under 20 years old (younger controls, $n=18$) and blood donors aged 21-40 without family history of cardiovascular diseases in interview ($n=43$). All studied polymorphisms were genotyped using a PCR-RFLP method. Obtained data were analyzed using *Statistica 6.0* and *EpilInfo* softwares. **Results.** The significantly higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol were found in the patients' group compared to younger control group ($p=0.034$ and $p=0.001$, respectively). The LDL-cholesterol level was also higher in patients in rather good state than in the younger controls ($p=0.03$). In the patients' group, younger control and blood donors groups we observed tendency to higher level of fibrinogen among subjects carrying the A allele of the *FGB* gene (genotypes AA and GA) in comparison with subjects carrying GG genotype. The frequency of AA homozygotes of the *FGB* gene was highest in the group of children with stroke in rather good clinic state (but not significantly) compared to the younger control group (17% vs 6%). The frequency of GA heterozygotes in the stroke group was lower than in the younger control group (47% vs 61%). In the patients group we did not observe the presence of mutation allele of factor V and prothrombin genes.

Key words: brain ischemic stroke, fibrinogen beta, factor II, factor V, polymorphism

WSTĘP

Udar niedokrwienny mózgu należy do wieloczynnikowych chorób naczyniowych, na których ujawnienie mają wpływ złożone interakcje pomiędzy czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Etiologia udaru niedokrwiennego mózgu u dzieci jest znacznie słabiej poznana niż u dorosłych, jednak wydaje się, że czynnik genetyczny może być szczególnie istotny ze względu na stosunkowo mały udział czynników środowiskowych. Do ważnych elementów w patogenezie udaru mózgu należą zaburzenia hematologiczne, predysponujące do zakrzepicy. Powstawaniu zakrzepicy sprzyja zarówno podwyższone stężenie czynników krzepnięcia krwi, jak i obniżone stężenie inhibitorów wykrzepiania. Wśród dziedzicznych zaburzeń hematologicznych związanych z udarem wymienia się m. in. zespół antyfosfolipidowy, deficyt białka S, białka C, antytrombiny III, plazminogenu [1]. Na ryzyko udaru mogą również wpływać polimorfizmy genów czynników krzepnięcia i fibrynolizy, które determinują poziom tych czynników w osoczu.

Jednym z powyższych polimorfizmów jest substytucja G>A w pozycji -455 pz w promotorze genu łańcucha β fibrynogenu (*FGB*). Fibrynogen jest dimerycznym białkiem składającym się z trzech typów łańcuchów polipeptydowych: α , β i γ kodowanych przez trzy geny. Jego produkcję determinuje synteza łańcucha β , dlatego polimorfizmy w obrębie genu *FGB* mogą mieć silny wpływ na koncentrację fibrynogenu w osoczu.

Centralnym elementem układu krzepnięcia jest czynnik V, który wraz z aktywnym czynnikiem X i w obecności jonów wapnia tworzy kompleks aktywujący protrombinę. Trombina prowadzi następnie do przekształcenia fibrynogenu w fibrynę. Działanie czynnika V krzepnięcia jest znoszone w wyniku jego degradacji przez aktywne białko C, co sprzyja zatrzymaniu procesu wykrzepiania. Mutacja G>A w pozycji 1691 w genie czynnika V (tzw. mutacja Leiden) prowadzi do zamiany argininy na glutaminę w jednym z trzech miejsc proteolitycznego rozszczepienia przez aktywne białko C. Sprawia to, że degradacja czynnika V zachodzi około 10-krotnie wolniej. Dlatego mutacja ta leży u podstaw zjawiska nazywanego opornością na aktywne białko C. Oporność ta jest częstą przyczyną zakrzepicy, której ryzyko zwiększa się około 80-krotnie u osób z genotypem homozygotycznym AA, natomiast u nosicieli (genotyp heterozygotyczny) ryzyko jest około 7-krotnie wyższe [2].

Protrombina jest prekursorem trombiny – enzymu proteolitycznego, który przekształca fibrynogen w monomery, a następnie polimery fibryny. Protrombina jest kodowana przez gen zlokalizowany na chromosomie 1. Najczęściej opisywanym polimorfizmem tego genu jest tranzycja G>A w pozycji 20210 w niekodującym regionie 3', który najprawdopodobniej pełni rolę w regulacji ekspresji genu. Obecność zmutowanego allelu zwiększa ryzyko zakrzepicy niemal 3-krotnie [3].

Celem niniejszej pracy jest analiza związku polimorfizmów -455G>A genu fibrynogenu β , 1691G>A genu czynnika V oraz 20210G>A genu protrombiny z przebyłym w dzieciństwie udarem niedokrwiennym mózgu oraz ustalenie genetycznych korelacji z trwałymi następstwami neurologicznymi występującymi po przebyłym udarze mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 111 białych osób rasy kaukaskiej, w tym dzieci po dokonaniu udaru niedokrwiennym mózgu, ich rodziców, osoby zdrowe do 20 roku życia bez klinicznych objawów neuro-

logicznych bez obciążeń rodzinnymi chorobami sercowo-naczyniowymi w wywiadzie oraz dobrowolnych dawców krwi w wieku 21–40 lat bez obciążeń rodzinnymi chorobami sercowo-naczyniowymi w ankiecie.

Grupę pacjentów stanowiło siedemnaścioro dzieci i młodych dorosłych w wieku od 2 do 27 lat (9 dziewcząt, 8 chłopców), którzy byli hospitalizowani w ostrej fazie niedokrwienia mózgu w Klinice Neurologii Wieku Rozwojowego SUM Katowice i nadal są objęte opieką ambulatoryjną. Dokonany udar niedokrwienny mózgu rozpoznano zgodnie z obowiązującymi kryteriami klinicznymi i potwierdzono badaniami neuroobrazującymi (TK i MR). Ocenę neurologiczną stanu pacjentów (grupa 1) przeprowadzano w skali Orgogozo, nazywanej przez autora „skalą tętnicy środkowej mózgu”. Skala ta pozwala na dokonanie obiektywnej oceny stanu świadomości, kontaktu słownego, ruchów oraz napięcia mięśniowego w obrębie kończyny górnej i dolnej, a także ruchów głowy i gałek ocznych. Uzyskanie 100 punktów oznacza, iż pacjent jest w pełnym, logicznym kontakcie słownym, nie stwierdza się także deficytów neurologicznych (porażenia/niedowład kończyn oraz mięśni twarzy), a ruchy głowy i gałek ocznych są prawidłowe. Mniejsza od 100 liczba punktów oznacza natomiast obecność deficytów ruchowych, zaburzeń świadomości i/lub zaburzeń mowy. Pacjentów podzielono na dwie podgrupy w zależności od ciężkości stanu pacjenta w okresie ostrym, od początku wystąpienia objawów klinicznych oraz dalszego przebiegu choroby i widocznych odległych następstw:

– pacjenci w ciężkim stanie (śpiączka, porażenie lub niedowład znacznego stopnia, poniżej 55 punktów w skali Orgogozo; n=9; wiek w czasie ostatnich badań kontrolnych od 8 do 27 lat) (podgrupa 1a),

– pacjenci w stanie dość dobrym (niedowład średnio lub słabo wyrażony, bez zaburzeń świadomości, powyżej 55 punktów w skali Orgogozo; n=6; wiek w czasie ostatnich badań kontrolnych od 2 do 17 lat) (podgrupa 1b).

Dwie pacjentki spośród całej grupy chorych nie mogły być zakwalifikowane do żadnej z podgrup ze względu na brak widocznych następstw poudarowych.

Grupę rodziców pacjentów stanowiło trzydziestu trzech zdrowych rodziców w wieku od 28 do 53 lat. Matka jednego pacjenta zmarła z powodu tętniaków tętnic nerkowych (grupa 2).

Grupę kontrolną stanowiło 61 osób bez klinicznych objawów neurologicznych i bez obciążeń rodzinnymi chorobami sercowo-naczyniowymi w wywiadzie w wieku od 7 do 40 lat (♀ n=12, ♂ n=49) (grupa 3). Osoby te były rekrutowane spośród pacjentów Kliniki Neurologii Wieku Rozwojowego ŚAM Katowice oraz dobrowolnych dawców krwi. Grupę tę podzielono na dwie podgrupy w zależności od wieku: 1) osoby do 20 roku życia, n=18, ♀ n=6, ♂ n=12 (grupa 3a), 2) osoby między 21 a 40 rokiem życia, n=43, ♀ n=6, ♂ n=37 (grupa 3b).

Wszystkie osoby włączone do badań wyraziły chęć uczestniczenia zgodnie z zasadami etycznymi i organizacją badań naukowych, na które uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym.

Analizy biochemiczne

Stężenia wskaźników gospodarki lipidowej: cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL i trójglicerydów oznaczano w świeżo pobranej surowicy za pomocą gotowych zestawów firmy Analco i spektrofotometrycznie.

tometru UV-VIS MINI 1240 firmy Schimadzu. Stężenie cholesterolu LDL obliczono wg wzoru Friedewalda [4]. Stężenie fibrynogenu oznaczano w świeżo pobranym osoczu za pomocą gotowych zestawów firmy bioMérieux i koagulometru *STArt 4* firmy Roche.

Analizy genetyczne

Izolację DNA z limfocytów krwi obwodowej wykonywano z użyciem gotowego zestawu MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Technologies). Stężenie i czystość izolatów DNA mierzono w spektrofotometrze UV-Vis mini 1240 (Schimadzu) przy $\lambda=260/280$ nm. Do identyfikacji i genotypowania wszystkich polimorfizmów zastosowano metodę RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), która opiera się na powieleniu wybranego fragmentu genu techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – ang. *Polymerase Chain Reaction*), a następnie trawieniu go specyficznym enzymem restrykcyjnym.

Amplifikację fragmentu genu *FGB* przeprowadzono przy użyciu pary starterów:

5' AAg AAT TTg ggA ATg CAA TCT CTg CTA CCT 3'
5' CTC CTC ATT gTC gTT gAC ACC TTg ggA C 3'

Zastosowano warunki wg własnej modyfikacji: wstępna denaturacja: 95° – 5 min, 30 cykli: denaturacja: 95° – 1 min, przyłączenie starterów: 65,7° – 1 min 30 s, wydłużanie: 72° – 2 min, końcowe wydłużanie: 72° – 30 min schłodzenie: 4°. Produkty reakcji PCR o wielkości 1301 pz trawiono enzymem restrykcyjnym *HaeIII* w temperaturze 37° przez 16 godzin. Trawienie restryktazą *HaeIII* dostarcza stałego fragmentu o wielkości 343 pz niezależnie od genotypu. Pozostałe fragmenty uzyskane po analizie restrykcyjnej charakteryzują się wielkościami określonymi dla danego genotypu. Genotypowi GG odpowiadają trzy produkty o wielkości 575 pz, 383 pz i 343 pz, genotypowi GA cztery – 958 pz, 575 pz, 383 pz i 343 pz, genotypowi AA dwa produkty o wielkości 958 pz i 343 pz.

Reakcję PCR dla genu czynnika V przeprowadzono przy użyciu następującej pary starterów:

F5' – GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC -3'
R5' – TCT CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA -3'

Zastosowano następujące warunki reakcji PCR: wstępna denaturacja: 94° – 5 min, 30 cykli: denaturacja: 95° – 1 min, przyłączenie starterów: 61° – 0,5 min, wydłużanie: 72° – 1,5 min, końcowe wydłużanie: 72° – 7 min. Produkt trawiono enzymem restrykcyjnym *MnII*, uzyskując dla allelu G fragmenty o długościach 118 i 43 pz, natomiast dla allelu A -fragment o długości 161 pz.

W celu powielenia fragmentu genu protrombiny użyto następującej pary starterów:

F5' – ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA*G C -3'
R5' – TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC -3'

Zastosowano następujące warunki reakcji PCR: wstępna denaturacja: 94° – 5 min, 30 cykli: denaturacja: 94° – 1 min, przyłączenie starterów: 55° – 1 min, wydłużanie: 72° – 1 min. Produkty amplifikacji trawiono enzymem restrykcyjnym *HindIII*, rozdzielano na 8% żelu poliakrylamidowym z 5% glicerolem i wybarwiano azotanem srebra. Produktem allelu G jest fragment o długości 345 pz. W przypadku allelu A uzyskuje się fragmenty o długościach 322 i 23 pz. Wszystkie reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze gradientowym Tgradient 96 firmy Biometra. Produkty trawienia rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym z 5% glicerolem i wybarwiano azotanem srebra. Żele suszono i dokumentowano przy użyciu systemu dokumentacji żeli Docprint core UV-Vis firmy Vilber Lourmat.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki analizowano za pomocą programów *Statistica 6.0* (STATSOFT; Statistica, Tulsa, OK, USA) i *EpiInfo 6* (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], Atlanta, GA, USA). Dane ilościowe oceniano pod względem zgodności z rozkładem normalnym przy użyciu testu Shapiro-Wilksa. Dla danych o rozkładzie normalnym średnie porównywano testem ANOVA, natomiast przy braku rozkładu normalnego stosowano test U Manna-Whitneya. Częstości alleli ustalano na podstawie częstości genotypów, zgodność rozkładu z równowagą Hardy-Weinberga określono za pomocą testu χ^2 . Porównanie częstości genotypów i alleli między grupami badanymi wykonano testem χ^2 . W przypadkach, gdy liczba danych w grupie była mniejsza niż 10, stosowano poprawkę Fishera. Za istotne statystycznie różnice przyjmowano te wartości, dla których $p < 0,05$.

Siłę asocjacji poszczególnych alleli i genotypów z dokonaniem udarem niedokrwiennym mózgu lub poudarowymi deficytami neurologicznymi określano na podstawie wartości współczynnika ilorazu szans (*odds ratio* – OR) z przedziałem ufności 95% (*confidence interval* – CI).

Test TDT (*transmission disequilibrium test*) wykorzystano do oceny stopnia przekazywania alleli polimorficznych przez rodziców heterozygotycznych dzieciom z udarem niedokrwiennym mózgu.

WYNIKI

W chwili wystąpienia ostrego niedokrwienia mózgu wiek pacjentów wahał się w granicach od 14 miesiąca życia do 15 roku życia. Badania kontrolne przeprowadzano w warunkach ambulatoryjnych (ostatnie badanie po upływie 10 miesięcy do 12 lat od wystąpienia udaru). Udar mózgu u wszystkich pacjentów dotyczył przedniego kręgu unaczynienia mózgu PACI (ang. *Partial Anterior Circulation Infarct*). Na obraz kliniczny w chwili wystąpienia ostrego niedokrwienia mózgu składały się: niedowład połowiczny (wszyscy pacjenci), towarzyszący ośrodkowy niedowład nerwu VII twarzowego po stronie niedowładu połowicznego (pięciu pacjentów), zaburzenia świadomości (czterech pacjentów), ból głowy (trzech pacjentów), zaburzenia czucia-afazja (jeden pacjent). W ostrej fazie choroby ocena stanu pacjentów kształtowała się w zakresie 35–55 punktów w skali Orgogozo (100 punktów w tej skali oznacza pełną sprawność). Uzyskane wyniki badania TCD były zgodne z obrazem klinicznym, najczęściej stwierdzano nieprawidłowości przemawiające za odcinkowym zwężeniem lub niedrożnością naczyń, przede wszystkim naczyń przedniego kręgu unaczynienia. U wszystkich pacjentów w ostrej fazie choroby wykonano badania neuroobrazowe (metodami TK i MRI), które ujawniły: w TK obecność ogniska hypodensyjnego, któremu odpowiadał obszar o podwyższonej intensywności sygnałów w sekwencji SE/T2 i PD oraz obniżonej intensywności w sekwencji SE/T1 w badaniu MRI.

Wyniki badań kontrolnych wykazały, że sześciu pacjentów było w stanie klinicznym dość dobrym z niedowładem średnio lub słabo wyrażonym, a w skali Orgogozo uzyskali powyżej 55 punktów (grupa 1b). Dziewięciu pacjentów było w stanie klinicznym ciężkim i wykazywało deficyt neurologiczny a w skali Orgogozo uzyskali oni poniżej 55 punktów. Dwie pacjentki spośród całej grupy chorych nie zostały zakwalifikowane do żadnej z podgrup ze względu na brak widocznych następstw udaru.

Badania neuroobrazowe wykazały obecność zmian poniedokrwiennych (malacyjnych lub jam poremfalicznych) w miejscach nieprawidłowych sygnałów stwierdzanych w ostrej fazie

choroby. Następstwem przebytego ostrego niedokrwienia mózgu jest deficyt neurologiczny wynikający z samego niedowładu połowicznego, przeważnie średniego stopnia (u trzech pacjentów) lub niedowładu połowicznego przeważnie średniego stopnia wraz z towarzyszącymi dysfunkcjami (u siedmiu pacjentów) o charakterze pogorszenia funkcji intelektualnych (u pięciu pacjentów) lub padaczki (u trzech pacjentów).

We wcześniejszym doniesieniu wykazano [5], że u badanych dzieci z dokonanym udarem niedokrwinnym mózgu współwystępowały różne czynniki ryzyka chorób naczyniowych mózgu, najczęściej dyslipidemie, w tym hipercholesterolemia u sześciu pacjentów, hipertrójglicydemia u dwu pacjentów, hiperlipoproteinemia u czterech pacjentów, dyslipidemia mieszana u jednego pacjenta, dodatkowo zespół antyfosfolipidowy u dwu pacjentów, deficyt białka S u czterech pacjentów, oporność na aktywną postać białka C APCR (ang. *Activated Protein C Resistance*) u dwóch pacjentów i deficyt białka C u jednego pacjenta. Stwierdzono współwystępowanie przynajmniej dwóch czynników ryzyka u dziewięciorga dzieci.

Wyniki wskaźników gospodarki lipidowej surowicy oraz poziom fibrynogenu w osoczu przedstawiono w tabeli 1.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą chorych (gr. 1), a grupą kontrolną do 20 roku życia (gr. 3a) w stężeniu cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL ($p=0,034$ i $p=0,001$). Średni poziom cholesterolu frakcji LDL był wyższy w grupie pacjentów po udarze w dość dobrym stanie klinicznym w porównaniu z kontrolą w wieku do 20 roku życia ($p=0,03$). Znamienne wyższy poziom cholesterolu frakcji HDL występował w grupie rodziców dzieci po udarze (gr. 2) niż w grupie kontrolnej w wieku 20–40 lat (gr. 3b) ($p=0,036$).

Średnie stężenia fibrynogenu w osoczu mieściły się w granicach normy we wszystkich badanych grupach. Nie wykazano znaczących różnic pomiędzy grupą dzieci chorych (gr. 1) a grupą krwiodawców poniżej 20 roku życia (gr. 3a), jak również pomiędzy rodzicami chorych dzieci (gr. 2) a krwiodawcami powyżej 20 roku życia (gr. 3b). W grupach pacjentów, dzieci zdrowych i krwiodawców zaobserwowano tendencję do występowania wyższego poziomu fibrynogenu wśród nosicieli allelu A (genotypy AA i GA) w porównaniu ze stężeniem u osób z genotypem GG. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie.

Analiza dystrybucji polimorficznych wariantów genu fibrynogenu β wśród badanych grup wykazała porównywalne częstości genotypu AA w grupie pacjentów i w grupie dzieci zdrowych (5,9% vs 5,6%). Częstość homozygot AA była najwyższa (jednak nieznamienne) w grupie dzieci po udarze w stanie klinicznym dość dobrym w porównaniu z grupą kontrolną do 20 roku życia (17% vs 6%). Liczba heterozygot GA była niższa w grupie dzieci po udarze oraz w grupie rodziców w porównaniu z dziećmi zdrowymi (47% vs 45,5% vs 61%), jednak różnice te nie były istotne statystycznie. Nie zaobserwowano również znamienych statystycznie różnic w częstości allelu A pomiędzy badanymi grupami (tab. 2). Analiza testem TDT wykazała, że stopień przekazywania alleli polimorficznych przez heterozygotycznych rodziców dzieciom z udarem nie odbiega znacząco od losowego.

W grupie dzieci po udarze nie stwierdzono obecności alleli mutacyjnych zarówno w genie czynnika V, jak i w genie protrombiny. Częstości tych alleli w całej grupie kontrolnej wyno-

siły odpowiednio: 3,3% dla allelu A genu czynnika V oraz 2,5% dla allelu A genu protrombiny (tab. 3 i 4).

DYSKUSJA

Podwyższony poziom fibrynogenu jest czynnikiem predysponującym zarówno do choroby niedokrwiennej serca, jak i do udaru mózgu [6]. Wcześniejsze dane wskazują na związek allelu A polimorfizmu $-455 G>A$ w genie kodującym łańcuch β fibrynogenu (*FGB*) z poziomem białka u osób dorosłych [7]. W populacji wieku rozwojowego nie stwierdzono takiej zależności [8]. Nasze badania wykazują jedynie tendencję do wyższego stężenia fibrynogenu u badanych, którzy są nosicielami allelu A (GA+AA). Częstość allelu A w grupie kontrolnej jest na porównywalnym poziomie z innymi populacjami kaukaskimi [9, 10]. Dotychczasowe badania związku polimorfizmu $-455 G>A$ z udarem niedokrwinnym mózgu przeprowadzono jedynie w populacji dorosłych, u których wykazano, że allel A wpływa na poziom fibrynogenu w osoczu i ma związek z chorobą [11, 12].

W badanej przez nas grupie chorych nie stwierdzono obecności alleli mutacyjnych genów czynnika V oraz protrombiny. Częstości tych alleli w grupie kontrolnej były natomiast porównywalne z częstościami charakterystycznymi dla innych populacji europejskich (4,4% dla genu czynnika V oraz 1,2% dla genu protrombiny) [2, 3]. Wcześniejsze prace wskazują na silny związek zarówno polimorfizmu genu czynnika V, jak i genu protrombiny z ryzykiem wystąpienia zakrzepicy żyłnej [2, 3]. Mniej jednoznaczne są wyniki dotyczące związku tych polimorfizmów z udarem niedokrwinnym mózgu u dorosłych [13–16]. Nieliczne prace dotyczą udziału czynników genetycznych w patogenezie udaru niedokrwinnego mózgu u dzieci. Nowak-Göttl i wsp. [17] badając grupę chorych dzieci w wieku od 6 miesięcy do 16 lat stwierdzili, że polimorfizmy w genach czynnika V, protrombiny oraz reduktazy metylenotetrahydrofolianowej są czynnikami ryzyka spontanicznego udaru. Wyniki te potwierdzone zostały u noworodków przez Günther i wsp. tylko w odniesieniu do polimorfizmu czynnika V [18].

Badania związku polimorfizmów genetycznych z udarem niedokrwinnym mózgu wieku rozwojowego, prowadzone przez nas wcześniej na tej samej grupie chorych dzieci, wykazały związek allelu C polimorfizmu $561A>C$ genu selektyny-E z udarem, a zwłaszcza z ciężkim stanem pacjenta po udarze i z widocznymi odległymi następstwami [19]. Zaobserwowaliśmy również korelację między allelem $\epsilon 4$ genu *APOE*, a udarem oraz częstsze występowanie allelu I polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu *ACE* u dzieci po udarze w stanie klinicznym ciężkim [20]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy, jak i w pracach wcześniejszych wymagają jednak potwierdzenia na większej grupie pacjentów. Obecnie nasze działania zmierzają do objęcia badaniami genetycznymi dzieci po przebytych udarach niedokrwinnym mózgu z innych regionów Polski. Dlatego też, mimo rzadkiego występowania tego schorzenia w populacji wieku rozwojowego, możliwe będzie znaczące powiększenie grupy badanej w przyszłości.

Tab. I. Wskaźniki gospodarki lipidowej w surowicy oraz poziom fibrynogenu w osoczu wśród badanych grup. *Parameters of serum lipids levels and plasma fibrinogen level among study groups*

	Cholesterol całkowity (mmol/l)	Cholesterol HDL (mmol/l)	Cholesterol LDL (mmol/l)	Triacyloglicerole (mmol/l)	Fibrynogen (mg/dl)
Pacjenci (grupa 1)					
Mediana (min.-max.)	4,53 (3,81–5,96)*	1,11 (0,67–2,05)	3,13 (1,71–4,32)*	1,10 (0,54–2,54)	262,0 (118,0–349,0)
Pacjenci w stanie ciężkim (grupa 1a)					
Mediana (min.-max.)	4,53 (3,91–5,96)	1,11 (0,67–2,05)	3,00 (1,71–4,32)	1,01 (0,54–2,54)	252,0 (153,0–349,0)
Pacjenci w stanie dość dobrym (grupa 1b)					
Mediana (min.-max.)	4,87 (4,14–5,83)	1,37 (0,85–1,55)	3,26 (2,28–4,12)*	1,14 (0,62–2,06)	265,0 (118,0–349,0)
Rodzice pacjentów (grupa 2)					
Średnia ± SD	4,49 ± 1,04	1,07 ± 0,42**	2,84 ± 1,12	1,24 ± 0,68	343,5 ± 74,70
Kontrola do 20 roku życia (grupa 3a)					
Mediana (min.-max.)	4,00 (2,61–6,16)	1,23 (0,59–2,59)	2,46 (1,29–3,13)	0,95 (0,40–1,69)	264,0 (165,0–370,0)
Kontrola powyżej 20 roku życia (grupa 3b)					
Średnia ± SD	4,46 ± 0,96	0,87 ± 0,31	9,99 ± 0,94	1,29 ± 0,51	305,7 ± 97,48

* Dane znamienne statystycznie przy $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną do 20 roku życia** Dane znamienne statystycznie przy $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną w wieku 20–40 lat**Tab. II.** Częstości genotypów i alleli polimorfizmu –455G>A genu *FGB* wśród badanych grup *Frequencies of genotypes and alleles of –455G>A polymorphism of FGB gene among study groups*

Grupa	n	Genotypy			Allele		
		GG	GA	AA	G	A	
Pacjenci (1)	17	n częstość	8 0,47	8 0,47	1 0,06	24 0,71	10 0,29
(1a) w stanie ciężkim ¹	9	n częstość	4 0,44	5 0,56	0 0	13 0,72	5 0,28
(1b) w stanie dość dobrym ²	6	n częstość	3 0,50	2 0,33	1 0,17	8 0,67	4 0,33
Rodzice pacjentów (2)	33	n częstość	17 0,51	15 0,46	1 0,03	49 0,74	17 0,26
Gr. kontrolna (3)	61	n częstość	25 0,41	30 0,49	6 0,10	80 0,66	42 0,34
(3a) do 20 lat	18	n częstość	6 0,33	11 0,61	1 0,06	23 0,64	13 0,36
(3b) 21–40 lat	43	n częstość	19 0,44	19 0,44	5 0,12	57 0,66	29 0,38

¹ Porażenie lub niedowład znacznego stopnia, śpiączka, poniżej 55 punktów w skali Orgogozo² Niedowład średnio lub słabo wyrażony, bez zaburzeń świadomości, powyżej 55 punktów w skali Orgogozo

Tab. III. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu 20210G>A genu *F II* wśród badanych grup *Frequencies of genotypes and alleles of 20210G>A polymorphism of F II gene among study groups*

Grupa	n	Genotypy			Allele		
			GG	GA	AA	G	A
Pacjenci (1)	17	n	17	0	0	34	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
(1a) w stanie ciężkim ¹	9	n	9	0	0	18	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
(1b) w stanie dość dobrym ²	6	n	6	0	0	12	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
Rodzice pacjentów (2)	33	n	32	1	0	65	1
		częstość	0,97	0,03	0	0,99	0,01
Gr. kontrolna (3)	61	n	58	3	0	119	3
		częstość	0,95	0,05	0	0,98	0,02
(3a) do 20 lat	18	n	17	1	0	35	1
		częstość	0,94	0,06	0	0,97	0,03
(3b) 21–40 lat	43	n	41	2	0	84	2
		częstość	0,95	0,05	0	0,98	0,02

¹ Porażenie lub niedowład znacznego stopnia, śpiączka, poniżej 55 punktów w skali Orgogozo

² Niedowład średnio lub słabo wyrażony, bez zaburzeń świadomości, powyżej 55 punktów w skali Orgogozo

Tab. IV. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu 1691G>A genu *F V* wśród badanych grup *Frequencies of genotypes and alleles of 1691G>A polymorphism of F V gene among study groups*

Grupa	n	Genotypy			Allele		
			GG	GA	AA	G	A
Pacjenci (1)	17	n	17	0	0	34	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
(1a) w stanie ciężkim ¹	9	n	9	0	0	18	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
(1b) w stanie dość dobrym ²	6	n	6	0	0	12	0
		częstość	1,00	0	0	1,00	0
Rodzice pacjentów (2)	33	n	31	2	0	64	2
		częstość	0,94	0,06	0	0,97	0,03
Gr. kontrolna (3)	61	n	57	4	0	118	4
		częstość	0,93	0,06	0	0,97	0,03
(3a) do 20 lat	18	n	17	1	0	35	1
		częstość	0,94	0,06	0	0,97	0,03
(3b) 21–40 lat	43	n	40	3	0	83	3
		częstość	0,93	0,07	0	0,97	0,03

¹ Porażenie lub niedowład znacznego stopnia, śpiączka, poniżej 55 punktów w skali Orgogozo

² Niedowład średnio lub słabo wyrażony, bez zaburzeń świadomości, powyżej 55 punktów w skali Orgogozo

PIŚMIENNICTWO

- [1] Hart R.G., Kanter M.C.: Hematologic disorders and ischemic stroke. A selective review. *Stroke*, 1990;21, 1111.
- [2] Rees D.C., Cox M., Clegg J.B.: World distribution of factor V Leiden. *Lancet*, 1995, 346:1133.
- [3] Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H. et al.: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 1996;88, 3698.
- [4] Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S.: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative centrifuge. *Clin. Chem.*, 1972;18, 499.
- [5] Kopyta I., Emich-Widera E., Marszał E.: Brain ischemic stroke in children – case analysis with the focus on risk factors. *Neurol. Dziec.*, 2002;11, 21.
- [6] Ernst E., Resch K.L.: Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann. Intern. Med.*, 1993;118, 956.
- [7] Tybjaerg-Hansen A., Agerholm-Larsen B., Humphries S.E. et al.: A common mutation (G-455->A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J. Clin. Invest.*, 1997;99, 3034.
- [8] Shea S., Isasi C.R., Couch S. et al.: Relations of plasma fibrinogen level in children to measures of obesity, the (G-455->A) mutation in the beta-fibrinogen promoter gene, and family history of ischemic heart disease: the Columbia University BioMarkers Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1999;150, 737.
- [9] Green F., Hamsten A., Blomback M. et al.: The role of beta-fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. *Thromb. Haemost.*, 1993;70, 915.
- [10] Humphries S.E., Ye S., Talmud P. et al.: European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G-455-A beta-gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women from different regions in Europe. Evidence for gender-genotype-environment interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1995;15, 96.
- [11] Liu Y., Pan J., Wang S. et al.: beta-fibrinogen gene -455A/G polymorphism and plasma fibrinogen level in Chinese stroke patients. *Chin. Med. J.*, 2002;115, 214.
- [12] Nishiuma S., Kario K., Yakushijin K. et al.: Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood. Coagul. Fibrinolysis.*, 1998;9, 373.
- [13] Lalouschek W., Aull S., Serles W. et al.: C677T MTHFR mutation and factor V Leiden mutation in patients with TIA/minor stroke: a case-control study. *Thromb. Res.*, 1999;93, 61.
- [14] Ridker P.M., Hennekens C.H., Lindpaintner K. et al.: Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 1995;332, 912.
- [15] De Stefano V., Chiusolo P., Paciaroni K. et al.: Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood*, 1998;91, 3562.
- [16] McColl M.D., Chalmers E.A., Thomas A. et al.: Factor V Leiden, prothrombin 20210G->A and the MTHFR C677T mutations in childhood stroke. *Thromb. Haemost.*, 1999;81, 690.
- [17] Nowak-Göttl U., Strater R., Heinecke A. et al.: Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood*, 1999;94, 3678.
- [18] Günther G., Junker R., Strater R. et al.: Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates: role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. *Stroke*, 2000;31, 2437.
- [19] Żak I., Sarecka B., Balcerzyk A. et al.: Polimorfizm PstI 561A-C genu selektywny-E i udar niedokrwienny mózgu u dzieci: pilotowe badanie związków. Część I. *Neurol. Dziec.*, 2004;13, 23.
- [20] Żak I., Balcerzyk A., Sarecka B. et al.: Polimorfizm epsilon genu apolipoproteiny E i polimorfizm insercyjno-delecyjny genu ACE a udar niedokrwienny mózgu u dzieci: pilotowe badanie związków. *Neurol. Dziec.*, 2005;14, 15.

Adres do korespondencji:

Katedra i Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice
e-mail: biogen@slam.katowice.pl