

Diagnostyka laboratoryjna i genetyczna niedoboru antytrombiny, białka C i białka S u chorych po incydentach zakrzepowych

Laboratory and genetic evaluation of antithrombin, protein C and protein S deficiency in patients following thrombotic events

Magdalena Szymańska¹, Ewa Wypasek^{1, 2}, Anetta Undas^{1, 2}

¹Ośrodek Nowoczesnej Diagnostyki Laboratoryjnej, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II

²Instytut Kardiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Wrodzone niedobory naturalnych antykoagulantów, tj. antytrombiny (AT), białka C (PC) i białka S (PS), występujące odpowiednio u 0,02–0,17%, 0,2–0,3% i 0,5% ogólnej populacji Europy, są związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (VTE), zarówno samoistnej, jak i wywołanej przejściowym czynnikiem ryzyka, na przykład zabiegiem operacyjnym. Częstość tych anomalii, w większości dziedziczonych autosomalnie dominująco, szacuje się na 0,5–4,9% w przypadku AT, 3% w przypadku PC i 2–12% w przypadku PS wśród chorych po pierwszym incydencie VTE. Jako testy przesiewowe przy podejrzeniu niedoboru AT, PC lub PS stosuje się oznaczenie aktywności tych białek. Poza wtórnymi przyczynami niedoborów, takimi jak choroby wątroby lub ciąża (w przypadku niedoboru PS), wynik testu aktywności może być niemiernodajny z powodu leczenia przeciwzakrzepowego heparyną w przypadku AT i antagonistami witaminy K w przypadku PC i PS. Nie zaleca się przeprowadzania badań u chorych z nowo rozpoznaną zakrzepicą. Diagnostyka laboratoryjna wrodzonych niedoborów białek antykoagulacyjnych powinna obejmować zarówno testy funkcjonalne, jak i pomiar stężeń antygenów AT, PC i PS w osoczu metodami immunologicznymi. Do potwierdzenia wrodzonego defektu i identyfikacji mutacji w genach SERPINC1, PROC i PROS1 kodujących naturalne antykoagulanty — odpowiednio AT, PC i PS — służą bezpośrednio sekwencjonowanie genów oraz, w części przypadków, metoda multipleksowej amplifikacji sondy zależnej od ligacji, umożliwiająca detekcję duplikacji i dużych delecji. Przeprowadzenie badań w kierunku niedoboru AT, PC i PS zaleca większość ekspertów u pacjentów w młodym wieku po epizodzie VTE bez wystąpienia przejściowych czynników ryzyka, szczególnie przy dodatnim wywiadzie rodzinnym, nawracających incydentach VTE i zakrzepicy żyłnej o nietypowej lokalizacji. Niedobór AT obciążony co najmniej 50-procentowym ryzykiem wystąpienia VTE w czasie życia jako silna trombofilia jest wskazaniem do przewlekłej terapii antykoagulacyjnej. Niedobory PC i PS u dorosłych po pierwszym epizodzie zakrzepowo-zatorowym nie są w większości przypadków wskazaniem do przewlekłej antykoagulacji, chyba że współistnieje inna trombofilia, na przykład czynnik V Leiden lub mutacja G20210A genu protrombiny.

Słowa kluczowe: niedobór antytrombiny, niedobór białka C, niedobór białka S, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, diagnostyka laboratoryjna

Hematologia 2014; 5, 3: 212–227

Adres do korespondencji: Anetta Undas, Instytut Kardiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Prądnicka 80, 31–202 Kraków, tel.: 12 614 30 04, faks: 12 614 26 52, e-mail: mmundas@cyf-kr.edu.pl

Abstract

Inherited deficiencies of natural anticoagulants such as antithrombin (AT), protein C (PC) and protein S (PS), with the prevalence of 0.02–0.17%, 0.2–0.3% and 0.5%, respectively, in the general population of Europe, are associated with an increased risk of venous thromboembolism (VTE), both spontaneous and induced by transient risk factor such as surgery. The frequency of these abnormalities — inherited in most cases in an autosomal dominant pattern — is estimated at 0.5–4.9%, 3%, 2–12% of patients after the first incident of VTE. The activity assay as the initial screening test of AT, PC or PS deficiencies is recommended. Beside the acquired causes of the deficiencies such as liver disease or pregnancy (in the case of PS deficiency), activity tests can be modified by anticoagulant treatments with heparin in case of AT and vitamin K antagonists in case of PC and PS. It is also not recommended to perform the laboratory investigation during the acute phase of thrombotic event. The laboratory investigation of congenital deficiency of anticoagulant proteins should include analysis of both functional activity and measurement of plasma concentration of AT, PC as well as PS with immunological methods. To confirm the inherited defect and identify mutations in the genes SERPINC1, PROC and PROS1 encoding the natural anticoagulants — respectively, AT, PC and PS — direct gene sequencing is used and in some cases multiplex ligation-dependent probe amplification, which allows to detect large deletions and duplications. Testing for deficiency of AT, PC and PS are recommended by most experts in patients with unprovoked episode of VTE at a young age, especially with positive family history of thrombosis, recurrent VTE and thrombosis at unusual sites. AT deficiency with 50% risk of developing VTE during lifetime as a severe thrombophilia is an indication for life-long anticoagulant therapy. Deficiencies of PC and PS in adults after the first VTE episode are not in most cases the indication for chronic anticoagulation, unless other thrombophilias for example factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation coexist.

Key words: antithrombin deficiency, protein C deficiency, protein S deficiency, venous thromboembolism, laboratory investigation

Hematologia 2014; 5, 3: 212–227

Wprowadzenie

Antytrombina (AT, *antithrombin*), białko C (PC, *protein C*) i białko S (PS, *protein S*) to endogenne inhibitory procesu krzepnięcia zapewniające równowagę w układzie hemostazy. Wrodzony niedobór naturalnych antykoagulantów jest genetycznie uwarunkowanym stanem nadkrzepliwości (trombofilia) predysponującym do wystąpienia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (VTE, *venous thromboembolism*), definiowanej jako zakrzepica żył głębokich (DVT, *deep vein thrombosis*) z zatorowością płucną (PE, *pulmonary embolism*) lub bez niej. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowego jest zbliżony w przypadku wszystkich trzech defektów i wynosi 30–40 lat [1]. Zakrzepica żył głębokich w niedoborze naturalnych antykoagulantów najczęściej dotyczy kończyn dolnych, ale poza tym może wystąpić w nietypowej lokalizacji, na przykład w żyłach głębokich kończyn górnych, w zatokach żylnych mózgu, żyłach nerkowych

i krezkowych [1, 2]. Zdarza się również zakrzepowe zapalenie żył powierzchownych kończyn dolnych, częstsze w przypadku niedoboru PC i PS w porównaniu z niedoborem AT [3]. Niedobory AT, PC i PS mogą również uczestniczyć w patogenezie zakrzepicy tętniczej, najczęściej w postaci udarów niedokrwiennych mózgu [4] i, rzadziej, zawału serca [5].

Epizody VTE na tle niedoboru białek antykoagulacyjnych najczęściej cechuje tendencja do nawracania i rodzinny charakter występowania, mogą być samoistne lub wywołane współwystępowaniem przejściowych czynników ryzyka zakrzepowego, takich jak: zabieg operacyjny (zwłaszcza ortopedyczny), długotrwałe unieruchomienie, ciąża, połów czy doustne środki antykoncepcyjne lub hormonalna terapia zastępcza [2, 6].

W przypadku podejrzenia trombofilii sugerowany przez Piazzę [7] algorytm postępowania obejmuje dwustopniową strategię. Kolejność badań jest determinowana częstością występowania

czynników ryzyka trombofilii, zwłaszcza w populacji z potwierdzoną klinicznie VTE. W pierwszym etapie badań diagnostycznych zaleca się identyfikację mutacji czynnika V Leiden, mutacji *G20210A* w genie protrombiny i badanie w kierunku zespołu antyfosfolipidowego. Jeżeli wyniki tych oznaczeń są negatywne, to drugi etap badań jest ukierunkowany na diagnostykę niedoborów AT, PC i PS. Z jednej strony wskazania do przeprowadzenia badań w kierunku niedoboru białek inhibitorowych AT, PC i PS są: VTE u osoby w wieku poniżej 30–40 lat bez wystąpienia przejściowych czynników ryzyka, nawracające incydenty VTE, zakrzepica żylna o nietypowej lokalizacji, dodatni wywiad rodzinny w kierunku VTE, incydenty VTE podczas ciąży czy stosowanie egzogennych estrogenów [7]. Jednak, z drugiej strony, Kyrle [8] sugeruje, że ze względu na nieznacznie zwiększone ryzyko nawrotów VTE badania przesiewowe w kierunku wrodzonych niedoborów AT, PC i PS u pacjentów po pierwszym epizodzie zakrzepowym nie powinny być wykonywane rutynowo.

W niniejszym artykule podsumowano wiedzę o diagnostyce niedoborów AT, PC i PS u dorosłych pacjentów z wywiadem w kierunku incydentów zakrzepowo-zatorowych kierowanych do poradni zaburzeń krzepnięcia w celu wyjaśnienia ich przyczyn.

Niedobór antytrombiny

Budowa i funkcja antytrombiny

Antytrombina jest najważniejszym endogennym inhibitorem procesu krzepnięcia. To jednolącuchowa glikoproteina, o masie 58 kDA, składająca się z 432 aminokwasów, w tym sześciu cystein tworzących trzy mostki dwusiarczkowe. Jest syntetyzowana głównie w wątrobie, ale również przez komórki śródbłonna, megakariocyty i płytki krwi. Antytrombina należy do inhibitorów proteaz serynowych. Antykoagulacyjna aktywność AT polega na inaktywacji trombiny (T, *thrombin*) i aktywnego czynnika X (Xa), w mniejszym stopniu również czynników IXa, XIa i XIIa. Ponadto AT pełni funkcję słabego inhibitora czynnika VIIa, ale tego związanego z czynnikiem tkankowym (TF, *tissue factor*) [2]. Poza działaniem antykoagulacyjnym AT wykazuje również działanie przeciwzapalne, zmniejszając zależne od trombiny i czynnika Xa uwalnianie cytokin prozapalnych. Poza tym AT pośrednio odgrywa rolę w hamowaniu aktywacji i agregacji płytek, stymulując uwalnianie prostacykliny przez komórki śródbłonna naczyń [9]. Dodatkowo niezwiązana z heparyną AT cechuje się zdolnością hamowania elastazy i endopeptydazy uwalnianych w reakcji

zapalnej i biorących udział w uszkodzeniu ścian naczyń krwionośnych [2]. Dane pochodzące z badań na zwierzętach wskazują na nową protekcyjną rolę AT w uszkodzeniach wątroby [10].

Dojrzałe białko AT ma dwie funkcjonalne domeny — argininowe centrum reaktywne zlokalizowane na C-końcu AT i domenę odpowiedzialną za wiązanie glikozaminoglikanów zlokalizowaną w N-terminalnej części białka AT. Centrum reaktywne działa jak pseudosubstrat dla centrum reaktywnego proteaz serynowych, tworząc nieodwracalny kompleks (T-AT), usuwany z krążenia przez układ siateczkowo-śródbłonkowy [11]. Podawana egzogennie heparyna oraz naturalne glikozaminoglikany, występujące na powierzchni śródbłonna naczyń, około 1000-krotnie zwiększają aktywność inhibitorową AT, która w warunkach fizjologicznych jest niska. Po związaniu z heparyną AT ulega zmianom konformacyjnym, które umożliwiają interakcję z aktywnym centrum proteaz serynowych. Utworzenie kompleksu między AT, trombiną i heparyną dłuższą niż 18 jednostek cukrowych (w tym zawierających specyficzną sekwencję pentasacharydową) jest niezbędne do hamowania trombiny przez AT, natomiast hamowanie czynnika Xa przez AT jest nasilane tylko przez związanie sekwencji pentasacharydowej heparyny z AT [12].

Cząsteczka AT przechodzi potranslacyjną modyfikację polegającą na przyłączaniu wiązaniem glikozydowym bocznych łańcuchów cukrowych do reszt kwasu asparaginowego w pozycjach Asn95, Asn135, Asn155 i Asn192. Taką glikozylowaną formę AT określa się jako α -AT i stanowi 90% krążącej AT. Pozostałe 10% to β -AT, która nie podlega glikozytacji w pozycji Asn135 i wykazuje większe powinowactwo do heparyny, jednak jej fizjologiczna rola pozostaje niewyjaśniona [13].

Gen antytrombiny (*SERPINC1*) jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 1 (q23-25) i składa się z siedmiu eksonów oraz sześciu intronów [2].

Klasyfikacja niedoborów antytrombiny

Wyróżnia się nabyty i wrodzony niedobór AT. Nabyty niedobór AT (tab. 1) może być wynikiem zaburzonej syntezy białka AT w przebiegu chorób wątroby, a także nadmiernej utraty AT, na przykład w zespole nerczycowym. Efektem zużycia AT w czasie ostrej fazy incydentu zakrzepowego i w zespole rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) jest obniżenie jej aktywności. Nabyty deficyt AT obserwuje się niekiedy w chorobach nowotworowych [2, 14].

Tabela 1. Nabyte przyczyny niedoborów antytrombiny (AT), białka C (PC) i białka S (PS)**Table 1.** Causes of acquired antithrombin (AT), protein C (PC) and protein S (PS) deficiency

Kategoria	Przyczyny niedoboru
Obniżona synteza	Choroby wątroby U wcześniaków i noworodków Niedobór witaminy K (dotyczy PC i PS)
Nadmierna utrata i zwiększone zużycie	Zespół nerczycowy Dializoterapia (dotyczy tylko AT) Sepsa z DIC Ostra faza epizodu zakrzepowego Urazy wielonarządowe Rozległe oparzenia Operacja Choroby nowotworowe Stany zapalne (dotyczy PC i PS)
Czynniki farmakologiczne	Terapia L-asparaginazą Terapia heparyną (dotyczy tylko AT) Terapia antagonistami witaminy K (dotyczy PS i PC) Długotrwała terapia estrogenami
Inne	Ciąża, HIV (dotyczy zwłaszcza PS)

DIC (*disseminated intravascular coagulation*) — zespół rozlanego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego; HIV (*human immunodeficiency virus*) — ludzki wirus nabytego niedoboru odporności

Podstawą klasyfikacji wrodzonego niedoboru AT są wyniki badań laboratoryjnych, w których określano zarówno aktywność, jak i stężenie antygeny AT. Wyróżnia się dwa typy wrodzonego niedoboru AT: typ I określany jako niedobór ilościowy i typ II — niedobór jakościowy. W typie I niedoboru występuje ograniczenie syntezy nieprawidłowego białka, co prowadzi do zmniejszenia aktywności i stężenia AT w osoczu. Typ II natomiast polega na zmniejszeniu aktywności AT przy prawidłowym stężeniu AT w osoczu. Sytuacja ta jest spowodowana obecnością w krążeniu dysfunkcyjnego białka [2]. W obrębie jakościowego defektu AT wyróżniono trzy podtypy. Podtyp II-RS (*reactive site*) jest wynikiem mutacji w obrębie centrum reaktywnego AT i wiąże się z dużym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy. W przypadku podtypu II-HBS (*heparin binding site*) mutacje dotyczą domeny wiążącej heparynę, a ryzyko wystąpienia epizodów zakrzepowych jest najniższe. Podtyp II-PE (*pleiotropic effect*) obejmuje pleiotropową grupę mutacji w AT, które są przyczyną upośledzenia jej funkcji, ale również powodują obniżenie stężenia antygeny AT w osoczu poprzez zmianę strukturalnej integralności i stabilności tego białka [15].

Wrodzony niedobór AT jest schorzeniem dziedzicznym w sposób autosomalny dominują-

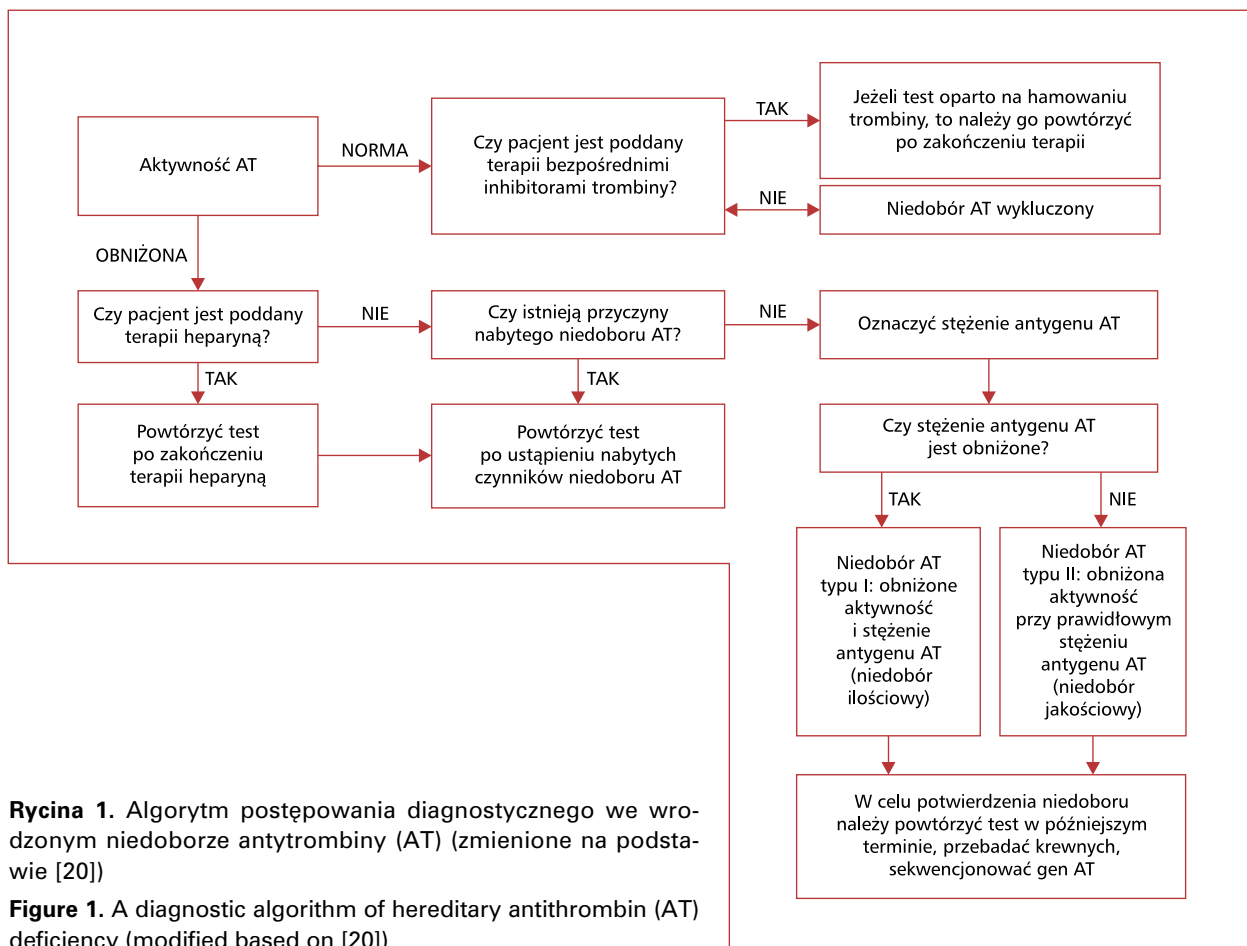
cy i większość chorych to heterozygoty. Bardzo rzadko występujące homozygoty opisano z mutacją w cząsteczce AT w obrębie domeny wiążącej heparynę (podtyp II-HBS niedoboru AT), u których zakrzepica żylna lub tętnicza może się pojawić już w okresie noworodkowym [11, 16].

Epidemiologia wrodzonego niedoboru antytrombiny

Niedobór AT opisano najwcześniej ze wszystkich niedoborów białek antykoagulacyjnych, bo już w 1965 roku [17]; wiąże się z najwyższym ryzykiem (sięgającym 50%) wystąpienia VTE w okresie życia, a ryzyko to wzrasta z wiekiem [1]. Wrodzony niedobór AT jest rzadkim defektem genetycznym i występuje w populacji ogólnej z częstością 0,02–0,17% [18]. Wśród pacjentów z potwierdzoną klinicznie VTE niedobór AT stwierdza się u 0,5–4,9% osób i u 0,5–7,0% osób z rodzinną trombofilią [19]. W populacji ogólnej typ II niedoboru AT występuje częściej niż typ I, przy czym wśród pacjentów z VTE w około 80% przypadków zdiagnozowano typ I niedoboru AT [2].

Diagnostyka laboratoryjna wrodzonego niedoboru antytrombiny

Jak ukazano na rycinie 1, w diagnostyce laboratoryjnej w celu wykrycia niedoboru AT jako badanie przesiewowe stosuje się test aktywności AT metodą chromogenną [20], ponieważ aktywność AT jest obniżona w obu typach niedoboru [21]. Oznaczanie aktywności AT metodą chromogenną opiera się na pomiarze stopnia hamowania trombiny lub czynnika Xa przez AT, pochodzącą z próbki pacjenta po dodaniu heparyny, w obecności tak zwanego substratu chromogenego, który zawiera specyficzny peptyd połączony z barwnym związkiem, zazwyczaj p-nitroaniliną (p-NA). Pozostające aktywne proteazy, których AT nie zahamowała, katalizują hydrolizę wiązania peptyd-p-NA i uwalniają p-NA, której ilość jest mierzona spektrofotometrycznie. Aktywność AT w badanej próbce jest odwrotnie proporcjonalna do intensywności zabarwienia [22]. W rutynowej diagnostyce obecnie częściej stosuje się test z zastosowaniem czynnika Xa niż trombiny, ponieważ w teście aktywności z użyciem trombiny wyniki mogą być zawyżone przez kofaktor II heparyny, który jest naturalnym inhibitorem tylko trombiny, a nie czynnika Xa. Interferencja kofaktora II heparyny w teście z użyciem trombiny ma szczególne znaczenie u pacjentów poddanych terapii heparyną i bezpośrednimi inhibitorami trombiny, na przykład biwalirudyną lub dabigatranem [23, 24]. Jednak w zakresie wykrywania niektórych



Rycina 1. Algorytm postępowania diagnostycznego we wrodzonym niedoborze antytrombiny (AT) (zmienione na podstawie [20])

Figure 1. A diagnostic algorithm of hereditary antithrombin (AT) deficiency (modified based on [20])

podtypów w typie II niedoboru AT test funkcjonalny oparty na hamowaniu czynnika Xa jest mniej wrażliwy [25]. Opisano również takie warianty AT, na przykład AT *Cambridge II*, które mogą być wykryte jedynie dzięki zastosowaniu więcej niż jednego testu lub dzięki odpowiedniej modyfikacji (skrócenie czasu preinkubacji) metody pomiarowej z użyciem trombiny [26, 27]. Ze względu na to, że w testach funkcjonalnych do określania aktywności AT wykorzystuje się heparynę, wynik zależy zarówno od zdolności AT do wiązania heparyny, jak i możliwości inhibicyjnych AT. Dlatego podtyp II-HBS, charakteryzujący się nieprawidłowym wiązaniem heparyny, może być zidentyfikowany jedynie w teście określającym aktywność AT, niezależnie od zdolności wiązania heparyny z zastosowaniem czynnika Xa, przy całkowitym braku heparyny lub bardzo niskim jej stężeniu i przedłużonym czasie inkubacji (tzw. test progresywny) [28].

Aktywność AT w większości laboratoriów jest wyrażana w procentach, a przedział referencyjny wynosi 80–120%, gdzie 100% odpowiada aktywności 1 jednostki AT w 1 ml osocza referencyjnego [21]. U większości heterozygotycznych pacjentów

z wrodzonym niedoborem AT jej aktywność mieści się w przedziale 40–60% [2]. W przypadku uzyskania nieprawidłowej wartości w teście aktywności AT, jak również wtedy, gdy wynik pozostaje na granicy normy (przedział 70–80%), rekomenduje się przeprowadzenie testu potwierdzającego na nowej próbce. Aby potwierdzić istnienie niedoboru, gdy wynik testu funkcjonalnego jest obniżony oraz określić typ niedoboru, należy oznaczyć stężenie antygenu AT w osoczu pacjenta odpowiednią metodą immunologiczną [21]. Obecnie najczęściej stosuje się nefelometryczny pomiar, który polega na rejestracji zmian zmętnienia roztworu podczas reakcji AT z komplementarnym przeciwciałem. Wartości referencyjne stężenia AT w osoczu w przypadku zastosowania metody nefelometrycznej wynoszą 0,19–0,31 g/l. Test immunoenzymatyczny (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) pozwala na określenie stężenia antygenu AT z użyciem specyficznych przeciwciał sprzężonych z enzymem, po dodaniu odpowiedniego chromogennego substratu. Kolejne metody, obecnie rzadziej wykorzystywane, służące do ilościowego określenia stężenia antygenu AT, to immunodyfuzja radialna i immunoelektro-

foreza według Laurella. Podstawą immunodyfuzji radialnej jest pomiar pierścienia precypitacyjnego powstałego w agarozie w wyniku interakcji między antygenem i specyficznym przeciwciałem znajdującym się w żelu. Immunoelektroforeza według Laurella natomiast to metoda ilościowa będąca połączeniem dwóch technik — immunodyfuzji radialnej i elektroforezy. W metodzie tej antygen przemieszcza się w żelu umieszczonym w polu elektrycznym zawierającym unieruchomione przeciwciała — stężenie antygeny określa się na podstawie wysokości szczytów precypitacyjnych powstałych wtedy, gdy antygen zostanie w całości związany przez przeciwciała.

Zastosowanie dodatkowej techniki ogniskowania izoelektrycznego, która polega na rozdziale elektroforetycznym białek w żelach poliakrylamidowych o odpowiednim gradiencie pH, umożliwia analizę procesu glikozylacji cząsteczki AT. W metodzie tej różnice w zakresie ruchliwości elektroforetycznej wynikają z odmiennego punktu izoelektrycznego (pI) nieprawidłowej izoformy AT o różnym stopniu glikozylacji, w efekcie czego występuje więcej niż jeden prążek AT. Nieprawidłowa glikozylacja cząsteczki AT jest podłożem niedawno odkrytej nowej postaci niedoboru AT. Mutacja polegająca na zamianie kwasu asparaginowego na treoninę w pozycji 135 łańcucha peptydowego AT powoduje wzrost stężenia w osoczu frakcji β -AT do około 30%, maskując w badaniach laboratoryjnych (wyniki na granicy normy) jakościowy i ilościowy niedobór AT [29]. Mutacje będące przyczyną niewłaściwego procesu glikozylacji AT mogą dotyczyć cząsteczki AT lub enzymów biorących udział w syntezie N-glikanów [30].

W diagnostyce laboratoryjnej wrodzonego niedoboru AT należy wykluczyć przyczyny niedoboru nabytego (tab. 1). Przy interpretacji wyników trzeba również uwzględnić leczenie przeciwzakrzepowe heparyną, która powoduje obniżenie stężenia AT nawet do 30% poprzez nasilenie formowania nieodwracalnych kompleksów T-AT w osoczu i inaktywacji AT. Z tego względu przeprowadzenie badań w kierunku niedoboru AT zaleca się około 5 dni po zakończeniu terapii. Nie zaleca się przeprowadzania badań w trakcie ostrej fazy zakrzepowej, aby uniknąć wyników fałszywie dodatnich. Oznaczenia najlepiej wykonać 3–6 miesięcy po wystąpieniu epizodu VTE [21].

Diagnostyka molekularna wrodzonego niedoboru antytrombiny

Analiza molekularna wrodzonego niedoboru AT nie jest stosowana w rutynowej diagnostyce. Jednak identyfikacja mutacji genu *SERPINC1* me-

todami biologii molekularnej pozwala na potwierdzenie klinicznie rozpoznanego wrodzonego niedoboru AT, a ponadto może być pomocna w określeniu typu niedoboru i oszacowaniu ryzyka rozwoju VTE. Diagnostykę genetyczną można przeprowadzić nawet w ostrej fazie choroby i podczas leczenia przeciwzakrzepowego, ponieważ materiałem do badań jest DNA izolowane z krwi obwodowej.

Bezpośrednie sekwencjonowanie, zwykle metodą Sangera, jest podstawową techniką molekularną umożliwiającą identyfikację zmian na poziomie DNA i polega na ustaleniu kolejności nukleotydów w analizowanym genie. Aby określić charakter zmiany, przeprowadza się analizę wpływu mutacji na właściwości biologiczne białka z użyciem odpowiednich programów komputerowych oraz porównawczą analizę międzygatunkową, która umożliwia określenie stopnia ewolucyjnego konserwowania zmutowanego podstawnika [31]. Uzupełnieniem sekwencjonowania genu, które umożliwia identyfikację substytucji oraz małych (kilka par zasad) delecji i insercji, często jest analiza multipleksowej amplifikacji sondy zależnej od ligacji (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*). Metodę tę stosuje się w celu wykrycia dużych delecji obejmujących jeden lub kilka eksonów albo nawet cały gen, co w klasycznym sekwencjonowaniu nie jest możliwe. W metodzie MLPA wykorzystuje się specyficzne sondy hybrydujące do komplementarnych badanych sekwencji DNA. Sondy te są konstruowane z dwóch fragmentów, które po hybrydyzacji do badanego obszaru ulegają ligacji i następnie amplifikacji podczas reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Uzyskane produkty amplifikacji są identyfikowane i określane ilościowo metodą elektroforezy kapilarnej. Ilość produktu zależy bezpośrednio od ilości matrycy, co jest widoczne jako zmiana intensywności fluorescencji podczas rozdziłu w elektroforezie kapilarnej w stosunku do prób referencyjnych [32].

Jeżeli bezpośrednio sekwencjonowanie ani analiza MLPA nie wykazały obecności mutacji w genie *SERPINC1* w przypadku badania AT, a u pacjenta utrzymuje się jej obniżona aktywność, to warto przeprowadzić analizę glikozylacji AT techniką ogniskowania izoelektrycznego (opisano wcześniej).

Mutacje będące przyczyną niedoboru AT stanowią niejednorodną grupę. Najczęściej występujące mutacje typu zmiany sensu polegają na zamianie pojedynczego nukleotydu w kodonie, czego konsekwencją jest zamiana aminokwasu w kodowanym białku. Mutacje zmiany sensu dotyczące peptydu sygnałowego AT mogą zahamować

transport przez błony komórkowe i sekrecję zmutowanego wariantu białka do osocza. Efektem mutacji powodujących substytucje aminokwasów zaangażowanych w tworzenie struktur przestrzennych białka może być wewnątrzkomórkowa degradacja, czemu towarzyszy osoczowy niedobór AT. Mniej powszechne są mutacje nonsensowne, w których przedwczesne wprowadzenie jednego z kodonów „stop” wiąże się z syntezą skróconego białka, co znacząco wpływa na jego funkcję. Z kolei mutacje miejsc splicingowych dotyczą połączeń intron–ekson i mogą prowadzić do nieprawidłowego składania mRNA, czego skutkiem jest powstanie niestabilnego białka. Rzadko występujące delecje i insercje powodują przesunięcie ramki odczytu i powstanie niefunkcjonalnego białka [2].

Profil mutacji w genie *SERPINC1* odpowiedzialnych za niedobór AT określono w populacji niemieckiej [33]. Uzyskane wyniki są spójne z danymi opublikowanymi w Bazie Danych Mutacji Genetycznych Człowieka (HGMD, *Human Gene Mutation Database*), <http://www.hgmd.org>. W badanej populacji pacjentów z niedoborem AT mutacje zmiany sensu stanowiły około 71% wszystkich mutacji, a kolejno mutacje miejsc splicingowych około 8% i mutacje nonsensowne około 7%. Krótkie delecje, insercje i duplikacje łącznie wystąpiły u około 9% pacjentów. Duże delecje, obejmujące nawet całe eksony, wykryto w 5% przypadków [33].

Ze względu na najwyższą (83,5%) wykrywalność mutacji w genie *SERPINC1*, u pacjentów z niedoborem AT wskazane jest przeprowadzenie diagnostyki molekularnej, nawet u osób z nieznacznie obniżoną aktywnością AT (70–75%) [33].

Niedobór białka C

Budowa i czynność białka C

Białko C jest zależną od witaminy K proteazą serynową o masie 62 kDa, złożoną z łańcucha ciężkiego (41 kDa) z domeną katalityczną i łańcucha lekkiego (21 kDa), połączonych mostkiem dwusiarczkowym między Cys141 i Cys265 [34]. Białko to jest syntetyzowane głównie w wątrobie, ale również przez komórki śródbłonna, nerek, płuc i nądrza w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 461 aminokwasów. Region N-końcowy łańcucha lekkiego PC zawiera domeny Gla, składające się z 9 reszt kwasu glutaminowego ulegającego karboksylacji podczas potranslacyjnej modyfikacji do kwasu γ -karboksylglutaminowego, potrzebnego do prawidłowego wiązania jonów Ca^{2+} . W obecności jonów Ca^{2+} domena Gla oddziałuje z ujemnie naładowanymi fosfolipidami

(fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanolamina) na powierzchni komórek, a także jest głównym miejscem interakcji PC ze śródbłonkowym receptorem białka C (EPCR, *endothelial protein C receptor*) [35]. Proteolityczna aktywacja proenzymu PC do aktywnego PC (APC, *activated PC*) polega na hydrolizie wiązania Arg169–Leu170, który uwalnia 12-aminokwasowy peptyd aktywacyjny z N-końcowej części łańcucha ciężkiego [34]. Reakcja ta zachodzi w obecności trombiny związanej z trombomoduliną na powierzchni komórek śródbłonna i jest wzmocniana około 20 razy po połączeniu się PC z EPCR [36]. Po aktywacji część APC oddysocjuje od EPCR, wiąże się z fosfolipidami błony komórkowej, gdzie degradowuje i inaktywuje kofaktory generacji trombiny, czyli czynnika Va, dla którego charakterystycznymi miejscami hydrolizy jest Arg w pozycjach 306, 506 i 679, i czynnika VIIa przy Arg 336, 562 i 740 [34, 37]. Procesy te przebiegają w obecności jonów Ca^{2+} , fosfolipidów i PS jako kofaktora reakcji. Aktywne PC hamuje aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (TAFI, *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*), przez co pośrednio może nasilać fibrynolizę [38]. Fibrynoliza jest również stymulowana przez zdolność APC do wiązania inhibitora tego procesu, jakim jest inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*) [39].

Coraz więcej doniesień wskazuje na to, że układ PC, oprócz swoich znanych właściwości przeciwzakrzepowych, pełni wiele dodatkowych funkcji, między innymi działa przeciwzapalnie i przeciwwzrostowo, w tym hamuje ekspresję genów cytokin prozapalnych i molekuł adhezyjnych, osłabia migrację neutrofilów i uwalnia ich mediatory [40–42]. Wykazano, że APC działa cytoprotekcyjnie w śródbłonku, a także w stosunku do limfocytów, komórek dendrytycznych czy neuronów [40, 42].

Gen kontrolujący syntezę PC (*PROC*) znajduje się na chromosomie 2 w pozycji 2q13-q14 i zawiera dziewięć eksonów kodujących 1,7 kb mRNA. Ekson 1 jest eksonem niekodującym oddzielonym długim intronem od inicjującego kodonu ATG, co jest wyjątkowym zjawiskiem wśród czynników zależnych od witaminy K [43].

Klasyfikacja niedoboru białka C

Niedobór PC może być nabyty lub wrodzony. Przyczyny nabytego niedoboru PC przedstawiono w tabeli 1. Białko C jest białkiem zależnym od witaminy K, dlatego niedobór witaminy K i terapia antagonistami witaminy K (VKA, *vitamin K antagonist*) powodują zmniejszenie aktywności PC. Zaburzona synteza PC występuje w przebiegu

chorób wątroby. Podobnie jak w przypadku AT, spadek aktywności PC w wyniku nadmiernego zużycia jest efektem ostrej fazy zakrzepowej, DIC czy zabiegów operacyjnych [6, 43].

Klasyfikacja wrodzonego niedoboru PC, podobna jak w przypadku niedoboru AT, obejmuje dwa główne typy: typ I — niedobór ilościowy (zmniejszona synteza nieprawidłowego białka, co powoduje spadki aktywności i stężenia PC w osoczu) i typ II — niedobór jakościowy (spadek aktywności PC przy prawidłowym stężeniu PC w osoczu). Wyróżnia się dwa podtypy w obrębie typu II, tj. podtypy IIa i IIb. W podtypie IIa występuje zmniejszona aktywność PC, zarówno ustalona metodą koagulometryczną, jak i za pomocą testu amidolitycznego, natomiast w podtypie IIb zmniejszona aktywność jest wykazana tylko za pomocą testu koagulometrycznego [6].

Wrodzony niedobór PC jest dziedziczony autosomalnie dominująco, przy czym większość mutacji ma charakter heterozygotyczny. Homozygoty z mutacją genu *PROC* są bardzo rzadkie i wiążą się z piorunującą plamicą i DIC występującą u noworodków [44, 45].

Epidemiologia wrodzonego niedoboru białka C

Niedobór PC po raz pierwszy opisali Griffin i wsp. w 1981 roku [46]. Heterozygotyczny niedobór PC występuje u 6% rodzin z trombofilią, u 3% pacjentów z pierwszym epizodem DVT oraz u 0,2–0,3% osób zdrowych [47]. U prawie 75% pacjentów z niedoborem PC stwierdza się typ I, a u pozostałych 25% typ IIa stanowi 95% przypadków. Typ IIb występuje niezmiernie rzadko [6].

Diagnostyka laboratoryjna wrodzonego niedoboru białka C

Podobnie jak w przypadku niedoboru AT, oznaczenie aktywności PC jest badaniem przesiewowym w przypadku podejrzenia niedoboru PC (ryc. 2) [48]. Testy funkcjonalne wymagają wstępnej aktywacji plazmatycznego PC i opierają się na pomiarze antykoagulacyjnej aktywności APC wobec naturalnych substratów, czyli czynnika Va i czynnika VIIIa lub na pomiarze aktywności amidolitycznej wobec syntetycznego substratu w teście chromogennym. W diagnostyce wrodzonych niedoborów PC należy stosować funkcjonalne testy koagulometryczne: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*), rzadziej — czas protrombinowy (PT, *prothrombin time*), czas krzepnięcia w obecności jadu żmii Russella (RVVT, *Russell's viper venom time*) [22].

Na wynik testu krzepnięciaowego wpływa wiele czynników, między innymi oporność na APC, wysoka wartość czynnika VIII (> 150%), obecność antykoagulantu tocznia (LA, *lupus antykoagulant*) czy terapia bezpośrednimi inhibitorami trombiny, istnieje więc ryzyko otrzymania fałszywych wyników. Jednak, aby temu zapobiec, można zastosować test amidolityczny po wcześniejszej aktywacji PC aktywatorem wyizolowanym z jadu węża — mokasyna miedziogłowego [24]. Test ten pozwala wykryć większość, ale nie wszystkie funkcjonalne defekty PC. Test chromogenny jest specyficzny dla wykrycia dysfunkcji katalitycznej PC, ale ponieważ jest niezależny od fosfolipidów, to upośledzone wiązanie fosfolipidów z powodu mutacji w genie *PROC* nie zostanie wykryte za jego pomocą. Podobnie może się stać w przypadku, gdy dysfunkcja PC jest spowodowana defektem w obrębie centrum aktywnego odpowiedzialnego za inaktywację naturalnych substratów [49]. Ponadto zastosowanie metody funkcjonalnej, opartej na pomiarze aktywności amidolitycznej, może spowodować niewykrycie podtypu IIb niedoboru PC, w którym aktywność PC mierzona tą metodą pozostaje w normie, a obserwuje się zmniejszenie aktywności PC w testach krzepnięciaowych [50].

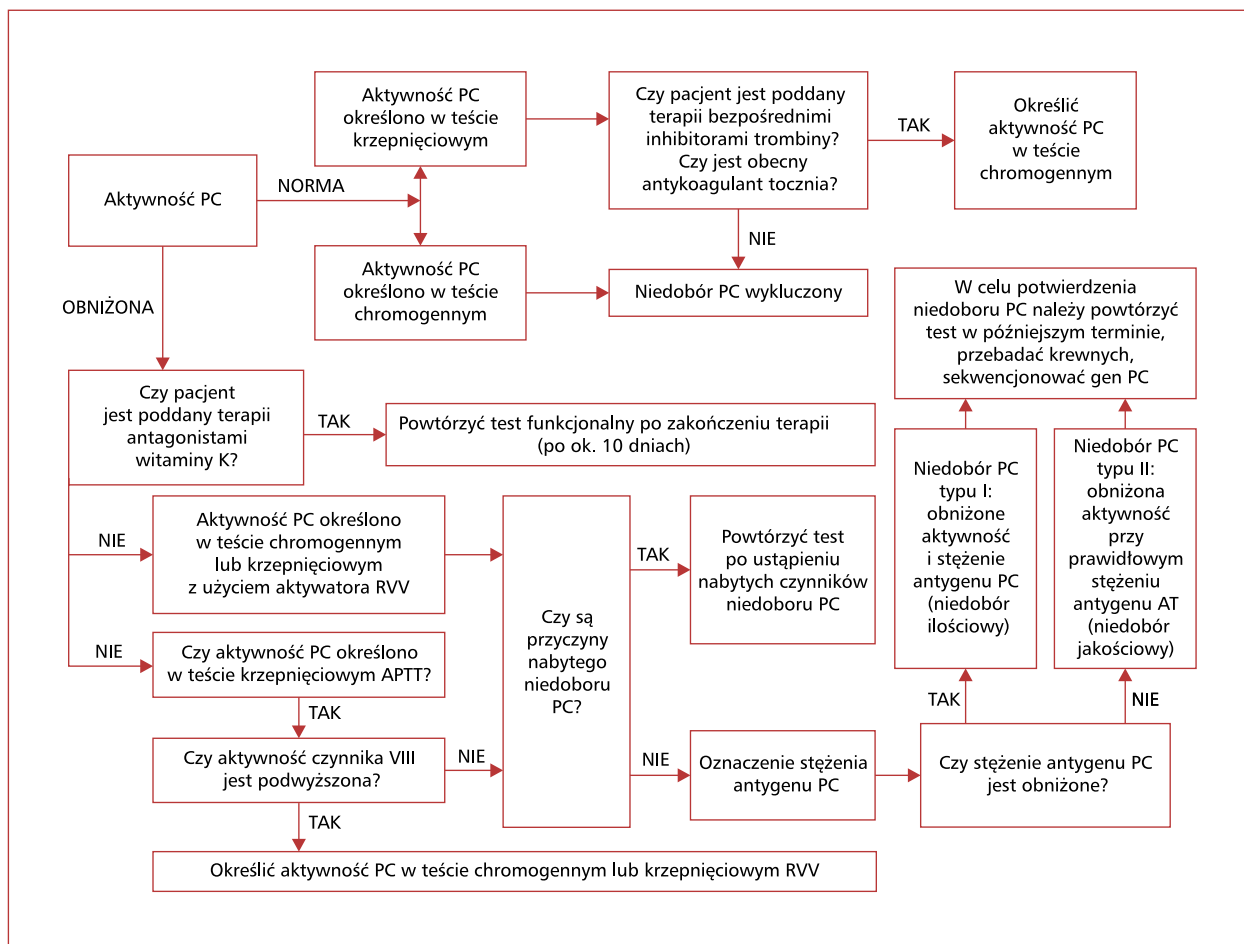
Aby określić typ niedoboru PC po przeprowadzonym teście funkcjonalnym, należy metodami immunologicznymi, podobnymi jak w przypadku pomiaru stężenia AT, określić stężenie antygenu PC. Wartości prawidłowe dla aktywności PC to 70–130%, a dla stężenia w osoczu — 2–6 mg/l [22].

Strategia diagnostyczna wrodzonego niedoboru PC powinna umożliwić wykluczenie przyczyny niedoboru nabytego (tab. 1). W interpretacji wyników należy uwzględnić również wpływ leków na badane parametry. Oznaczeń PC nie należy wykonywać u pacjentów przyjmujących VKA. Rekomenduje się przeprowadzenie badania 10–14 dni po odstawieniu VKA; na ten czas można włączyć leczenie heparyną [48].

Diagnostyka molekularna wrodzonego niedoboru białka C

Metody molekularne stosowane w diagnostyce niedoboru PC są takie same, jak wcześniej opisane w odniesieniu do niedoboru AT.

Mutacje powodujące niedobór PC, podobnie jak w przypadku AT, stanowią heterogenną grupę. Profil mutacji w genie *PROC* odpowiedzialnych za niedobór PC określono w populacji niemieckiej, a wykrywalność mutacji wynosiła 70–80% [33]. Niedobór PC najczęściej był wywołany przez mutacje



Rycina 2. Algorytm postępowania diagnostycznego we wrodzonym niedoborze białka C (PC) (zmienione na podstawie [48]); RVV — jad żmii Russella; APTT — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

Figure 2. A diagnostic algorithm of hereditary protein C (PC) deficiency (modified based on [48]); RVV — Russell’s viper venom; APTT — activated partial thromboplastin time

zmiany sensu (odpowiednio 78%), a następnie mutacje nonsensowne (11%), mutacje wpływające na *splicing* (7%), małe duplikacje/insercje/delecje (2%) oraz duże delecje (2%) [33]. U pacjentów z aktywnością PC powyżej 70% nie zaleca się poszerzenia diagnostyki o analizę genu *PROC* ze względu na bardzo małe prawdopodobieństwo wykrycia mutacji [33].

Niedobór białka S

Budowa i czynność białka S

Białko S jest kolejnym, zależnym od witaminy K naturalnym antykoagulantem. Dojrzałe PS to jednonańcuchowa glikoproteina o masie 75 kDa składająca się z 635 aminokwasów. Białko S pełni rolę kofaktora antykoagulacyjnego działania APC i jest syntetyzowane głównie przez hepatocyty, a także

przez komórki śródbłonna, komórki śródmiąższowe Leydiga i megakariocyty. Około 60% PS tworzy niekowalencyjne kompleksy z białkiem wiążącym dopełniacz (*C4BP*, *C4b-binding protein*), natomiast pozostałe 40% to wolna forma PS [51]. Obie formy PS mogą służyć jako kofaktory APC w proteolizie aktywnego czynnika Va i czynnika VIIIa, ale wolna forma PS jest bardziej efektywna [52]. Wszystkie czynniki zwiększające stężenie składowej dopełniacza *C4BP* ograniczają dostępność PS i w ten sposób hamują aktywność układu PC (tab. 1) [22]. Białko S wykazuje największe spośród wszystkich białek zależnych od witaminy K powinowactwo do ujemnie naładowanych fosfolipidów błonowych i dzięki temu powoduje wzrost powinowactwa APC do tych fosfolipidów. Dowiedziono również, że białko to cechuje niezależna od APC aktywność przeciwkrzepliwa (bezpośrednie hamowanie kom-

pleksu protrombinazy i tenazy) [53, 54]. Dodatkowo PS inaktywuje czynnik Xa, będąc kofaktorem inhibitora szlaku czynnika tkankowego (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) oraz wzmacnia fibrynolizę przez obniżenie aktywności TAFI [55].

Zarówno aktywny gen dla PS (*PROS1*), jak i transkrypcyjnie nieaktywny pseudogen (*PROS2*) jest zlokalizowany na chromosomie 3 w pozycji 3q11.1-3q11.2 i wykazuje 97-procentową homologię. Gen *PROS1* zawiera 15 eksonów kodujących 3,5 kb mRNA. Obecność *PROS2* może utrudniać rozpoznanie wrodzonego niedoboru PS [43].

Klasyfikacja niedoboru białka S

Wyróżnia się nabyty i wrodzony niedobór PS. Przyczyny nabytego niedoboru PS (tab. 1) są w większości przypadków takie same, jak niedoboru PC. Należy zaznaczyć, że niedobór PS obserwuje się u kobiet od początku ciąży i u pacjentów z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) [6, 43]. Genetycznie uwarunkowany niedobór PS dzieli się na trzy typy: typ I — obniżenie stężeń całkowitego i wolnego PS oraz obniżona jego aktywność; typ II — prawidłowe stężenia całkowitego i wolnego PS, ale obniżona jego aktywność; typ III — obniżone stężenie wolnej frakcji i aktywności PS przy prawidłowym stężeniu całkowitego PS [56].

Niedobór PS dziedziczny się w sposób autosomalny dominujący. Heterozygotyczny niedobór występuje w większości przypadków. Homozygotyczne deficyty PS prowadzą do zakrzepicy występującej już w okresie noworodkowym i mają postać płamicy piorunującej [43].

Epidemiologia wrodzonego niedoboru białka S

Niedobór PS po raz pierwszy opisano w 1984 roku [57]. Niedobór ten stwierdza się częściej niż niedobór PC, a jego występowanie szacuje się na mniej niż 0,5% w ogólnej populacji europejskiej i 2–12% wśród pacjentów z VTE [58]. Pacjenci z niedoborem typu I i III stanowią 95% wszystkich pacjentów z niedoborem PS [43].

Diagnostyka laboratoryjna niedoboru białka S

Diagnostycznie niedobór PS stwarza najwięcej trudności spośród wszystkich wrodzonych czynników leżących u podstaw trombofilii. Sytuacja ta jest częściowo spowodowana specyfiką PS, które wykazuje funkcje antykoagulacyjne, ale nie przejawia aktywności enzymatycznej. Dostępne funkcjonalne testy są oparte na pomiarze aktywności PS jako kofaktora APC, z tego powodu oporność na APC, podwyższona aktywność czynnika VIII

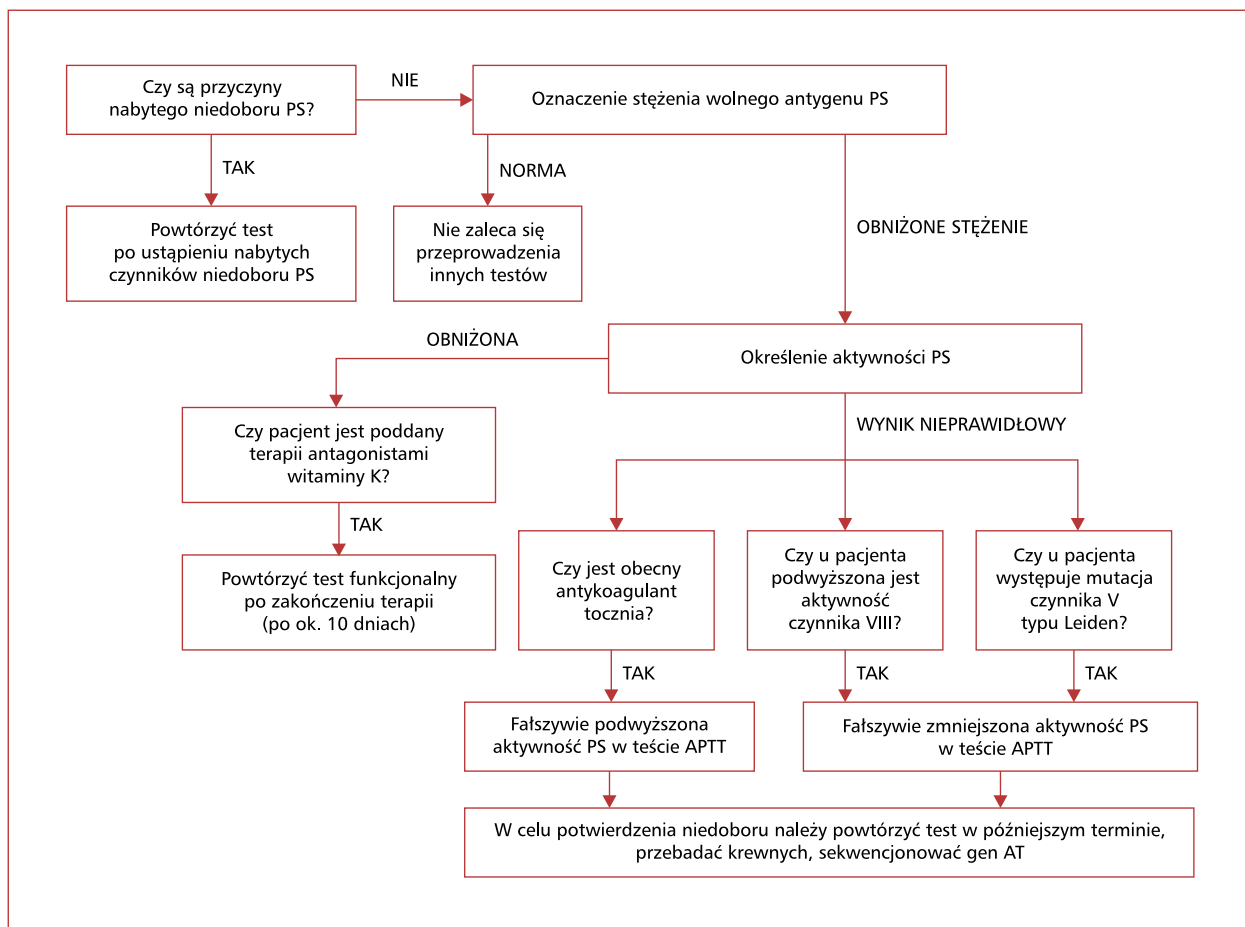
czy obecność LA w dużym stopniu wpływają na wynik końcowy [24]. Podobnie jak w przypadku PC aktywność PS jest oznaczana zarówno metodami koagulometrycznymi, jak i metodą chromogenną. W testach tych określa się szybkość inaktywacji czynnika Va przez dodany do badanej próbki APC. W tej sytuacji szybkość inaktywacji czynnika Va zależy od stężenia i aktywności PS będącego kofaktorem PC [24].

Po stwierdzeniu obniżonej wartości w teście aktywności PS należy oznaczyć stężenie antygenu PS w osoczu. Oznaczenie to metodą ELISA stwarza pewne trudności ze względu na fakt, że około 60% PS występuje w formie związanej z białkiem wiążącym składową C4b układu dopełniacza, a około 40% — w formie wolnej. Oznaczenie tylko wolnej frakcji PS będącej kofaktorem PC wymaga wcześniejszego przygotowania próbki w celu oddzielenia wolnego PS od związanego PS lub zastosowania w teście przeciwciał monoklonalnych rozpoznających tylko wolne PS [59]. W przypadku pomiaru całkowitego PS metodą ELISA stosuje się dłuższy czas inkubacji, aby umożliwić uwolnienie PS z kompleksu C4bBP [49]. Występujący w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych wzrost stężenia białka C4bBP wiążącego PS powoduje zmniejszenie aktywności PS i obniżenie stężenia wolnej, aktywnej antykoagulacyjnie frakcji PS w osoczu, nie wpływając jednocześnie na frakcję całkowitą [24]. W celu wykrycia niedoboru PS zaleca się oznaczenie wolnej formy PS. Oznaczenie całkowitego PS w osoczu jest pomocne w określeniu typu niedoboru. Ze względu na wpływ wielu czynników fazy przedanalizycznej i analitycznej na wynik testu funkcjonalnego oznaczenie ilościowe wolnej frakcji PS zaproponowali Marlar i Gausman [59] jako test poprzedzający określenie aktywności PS w diagnostyce niedoboru tego białka (ryc. 3) [60]. Jednak przy takim podejściu istnieje ryzyko niewykrycia rzadkiego niedoboru PS typu II, w którym występuje prawidłowe stężenie frakcji wolnej PS [61, 62]. Wartości referencyjne aktywności PS zależą od płci i wynoszą 60–114% u kobiet i 67–139% u mężczyzn; prawidłowe stężenie całkowite białka S waha się w granicach 17–35 mg/l [22].

Podobnie jak w przypadku PC stężenie PS może być obniżone przez leczenie VKA i przez inne czynniki wymienione w tabeli 1.

Diagnostyka molekularna wrodzonego niedoboru białka S

Metody molekularne stosowane w diagnostyce wrodzonego niedoboru PS opierają się na



Rycina 3. Algorytm postępowania diagnostycznego we wrodzonym niedoborze białka S (PS) (zmienione na podstawie [60]); APTT — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

Figure 3. A diagnostic algorithm of hereditary protein S (PS) deficiency (modified based on [60]); APTT — activated partial thromboplastin time

sekwencjonowaniu genu *PROS1* i analizie MLPA. Charakterystyka mutacji genu *PROS1* w populacji niemieckiej wykazała, że mutacje zmiany sensu występowały u 63% pacjentów z niedoborem PS, mutacje miejsca splicingowego — u 13%, mutacje nonsensowne — u 9%, małe duplikacje/insercje/delecje wykryto u 9% pacjentów, natomiast duże delecje stanowiły 6% wykrytych mutacji w genie *PROS1* [33]. Dane te są spójne z profilem mutacji w genie *PROS1* przedstawionym w bazie HGMD. Wykrywalność mutacji w rodzinach z niedoborem PS wynosiła około 50% [33, 63]. Powodem niższej wykrywalności mutacji w obrębie genu *PROS1* w porównaniu z genami *SERPINC1* i *PROC* może być wpływ innych czynników niż genetyczne na stężenie PS, tj. wieku, płci, ciąży, stosowania antykoncepcji itp. [33, 64]. U pacjentów z aktywnością PS powyżej 55% nie zaleca się poszerzenia diagnostyki o analizę genu *PROS1* [33].

Profilaktyka i leczenie stosowane w niedoborach antytrombiny, białka C i białka S

W stanach zwiększonego ryzyka zakrzepowego, na przykład po urazie, niewykazujące objawów osoby z niedoborem endogennych inhibitorów procesu krzepnięcia powinny być poddane profilaktyce przeciwzakrzepowej, zwłaszcza wtedy, gdy wywiad rodzinny w kierunku VTE jest dodatni. Taka strategia dotyczy również kobiet w ciąży [65]. Jednak, biorąc pod uwagę ryzyko krwawień i koszty, profilaktyka powinna być rozważona u każdego nosiciela cechy osobno, pamiętając, że najwyższe ryzyko powikłań dotyczy osób z niedoborem AT.

Leczenie VTE u pacjentów z wrodzonymi niedoborami AT, PC i PS jest w większości przypadków takie samo, jak u innych chorych z VTE, zarówno w ostrej fazie choroby, jak i w profilaktyce wtórnej [65]. Pacjenci z niedoborem AT mogą wykazywać

Tabela 2. Genetyczne podłoże wrodzonego niedoboru antytrombiny (AT) u polskich pacjentów (źródła [67–72])

Table 2. The genetic background of congenital antithrombin (AT) deficiency in Polish patients (sources [67–72])

Pacjent	Typ mutacji	Wyniki badań laboratoryjnych		Kliniczna manifestacja/wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowego	Typ niedoboru	Referencja
		Test aktywności AT	Stężenie antygeny AT			
1.	g.13296 G>A Arg393His	62* 52* 60*	90** 57** 102**	VTE/27 lat VTE/27 lat VTE/31 lat	II-RS	[68]
2.	g.13322 T>C Phe402Leu	66* 66*	48** 58**	Brak objawów VTE/49 lat	II-PE	[68]
3.	g.13328 G>C Ala404Pro Nowa mutacja	62*	61**	VTE/41 lat	II-PE	[68]
4.	g.5356-58Del.CTT Nowa mutacja	39* 52* 42*	Brak wyniku 55** 57**	VTE/31 lat VTE/28 lat VTE/33 lata	I	[68]
5.	g.5355 A>G His120Arg Nowa mutacja	50* 56*	Brak wyniku 54**	VTE/26 lat VTE/19 lat	I	[68]
6.	g.9819 C>T Arg359Stop	48*	52**	VTE/20 lat	I	[68]
7.	g.13337 C>A Pro407Thr	55*	64**	VTE/32 lata	II-PE	[68]
8.	g.5381 C>T Arg129Stop	44*	48**	VTE/48 lat	I	[68]
9.	g.9805 T>C Arg393Cys	49*	71**	VTE/28 lat	II-RS	[68]
10.	g.9805 T>C Ile354Thr Nowa mutacja	61*	72**	VTE/22 lata	I	[68]
11.	Antytrombina Kraków Del.A w kodonie 438, przesunięcie ramki odczytu: Stop Kodon 444 Nowa mutacja	56,3%# 38,2%#	0,16 g/l## 0,10 g/l##	30 lat Brak objawów (epizody zakrzepowe u członków rodziny z potwierdzoną mutacją AT Kraków: VTE, zawał serca) Zakrzepica tętnicza u noworodka	I	[67]
12.	Antytrombina Kraków II c.624+1 G>T Mutacja miejsca splicingowego Nowa mutacja	53%#	0,15 g/l##	VTE/26 lat	I	[69]
13.	g.9788 G>A Mutacja miejsca splicingowego	58%#	0,17 g/l##	VTE/39 lat Udar niedokrwienny mózgu/41 lat Przemijające ataki niedokrwienne mózgu/43 lata	I	[70]
14.	Antytrombina Rybnik c.683 G>T Gly228Val Nowa mutacja	46%#	0,15 g/l##	VTE/22 lata Nawracające zapalenie żył powierzchniowych kończyn dolnych	I	[71]
15.	Antytrombina Katowice Del. Ex1 Nowa mutacja	50%#	0,13 g/l##	VTE/44 lata	I	[72]

*Wyrażone w jm./dl — przedział referencyjny 75–125 jm./dl; **wyrażone w jm./dl — przedział referencyjny 73–130 jm./dl; #przedział referencyjny 70–120%; ##przedział referencyjny 0,19–0,31 g/l; VTE (venous thromboembolism) — żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

Tabela 3. Genetyczne podłoże wrodzonego niedoboru PC i PS u polskich pacjentów [66, 73–77]

Table 3. The genetic background of congenital PC and PS deficiency in Polish patients [66, 73–77]

Pacjent	Typ mutacji	Wyniki badań laboratoryjnych		Kliniczna manifestacja/ /wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowego	Typ niedoboru	Referencja
		Test aktywności PC (%)	Stężenie antygeny PC (%)			
PROC						
1.	c.109G>C p.Gly109Arg	48 i 58*	46 i 59%**	STEMI/28 lat	I	[73]
2.	c.106T>C p.Cys 106Arg Nowa mutacja	42*	44 i 41**	DVT/PE/29 lat	I	[74]
PROS1						
		PS wolne (%)	PS całkowite (%)			
1.	Delecja egzonów 1–12 Nowa mutacja	18,9 i 18,8 [#]	40 ^{##}	DVT/25 lat	I	[75]
2.	Heerlen polymorphism p.Ser501>Pro	52,8 i 55,8 [#]	110,5 ^{##}	DVT/50 lat	III	[76]
3.	Heerlen polymorphism p.Ser501>Pro	31,8 i 34,1 [#]	81,6 ^{##}	STEMI/45 lat	III	[77]
4.	Duplikacja GA p.Tyr131AspfsX3 Nowa mutacja	15,4 [§]	60,2 [§]	VTE/17 lat	III	[66]
5.	c.1020C>A p.Tyr 340X Nowa mutacja	8,0 [#]	65,1 ^{##}	DVT/42 lata	III	[66]

*Przedział referencyjny 70–140%; **przedział referencyjny 65–140%; #przedział referencyjny 74–146%; ##przedział referencyjny 75–140%; §przedział referencyjny 55–124%; [§]przedział referencyjny 74–146%; STEMI (*ST elevation myocardial infarction*) — ostry zespół wieńcowy z uniesieniem odcinka ST; DVT (*deep vein thrombosis*) — zakrzepica żył głębokich; PE (*pulmonary embolism*) — zatorowość płucna; VTE (*venous thromboembolism*) — żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

oporność na leczenie heparyną niefrakcjonowaną i drobnocząsteczkową i w związku z tym wymagać większych dawek tych leków, aby osiągnąć efekt terapeutyczny [2]. U chorych z niedoborami PC i PS w pierwszych dniach leczenia VKA może wystąpić martwica skóry, najczęściej na tułowiu [65].

Niedobór AT, obarczony co najmniej 50-procentowym ryzykiem wystąpienia VTE w okresie życia jako silna trombofilia, jest wskazaniem do przewlekłej terapii antykoagulacyjnej już po pierwszym epizodzie choroby. Natomiast niedobory PC i PS u dorosłych po pierwszym epizodzie zakrzepowo-zatorowym nie są w większości przypadków wskazaniem do przewlekłej antykoagulacji, chyba że współistnieje inna trombofilia, na przykład czynnik V Leiden lub mutacja *G20210A* genu protrombiny [65]. Po dwóch incydentach VTE pacjenci z niedoborami AT, PC i PS, podobnie jak osoby bez tych nieprawidłowości, mają wskazanie do antykoagulacji do końca życia, chyba że terapia ta powoduje poważne krwawienia lub nie jest akceptowana przez chorego. Obecnie u chorych z VTE i niedoborem jednego z inhibitorów krzepnięcia

stosuje się VKA lub rivaroksaban bądź dabigatran (zarejestrowany w tym wskazaniu wiosną 2014 r.). Czy nowe doustne antykoagulanty są równie skuteczne jak VKA u takich chorych? Aktualne dane wskazują, że obie grupy leków są równie skuteczne, poza rzadkimi poważnymi niedoborami, jak to niedawno opisano w odniesieniu do dwóch chorych z wrodzonym niedoborem PS poniżej 20% nieskutecznie leczonych rivaroksabanem w pierwszych miesiącach zakrzepicy [66].

Niedobory antytrombiny, białka C i białka S opisane u polskich chorych

Dotychczas opublikowano opisy 15 różnych typów mutacji odpowiedzialnych za wrodzony niedobór AT u polskich pacjentów (tab. 2); 8 z nich to nowe mutacje w genie *SERPINC1* [67–72]. W przypadku niedoboru PC opublikowano opisy dwóch mutacji genu *PROC*, z czego jedna nie była dotąd opisywana w literaturze [73, 74]. Molekularne podłoże niedoboru PS opisano u 5 polskich pacjentów, z czego trzy mutacje w genie *PROS1* to nowe mutacje [66, 75–77] (tab. 3).

Podsumowanie

Niedobór AT, PC i PS narusza równowagę między procesami prozakrzepowymi i mechanizmami antykoagulacyjnymi. Niedobór tych inhibitorów krzepnięcia jest przyczyną wrodzonej trombofilii. Większość ekspertów zaleca wykluczenie tych niedoborów u chorych z VTE występującą w młodym wieku, zwłaszcza w przypadku dodatniego wywiadu rodzinnego. Badaniami przesiewowymi u takich pacjentów są testy aktywności AT, PC lub PS.

Pacjenci z niedoborem AT, PC lub PS oraz posiadający mutacje w genach *SERPINC1*, *PROC*, *PROS1* są w grupie zwiększonego ryzyka nawrotu incydentów zakrzepowo-zatorowych. Wskazane jest także poradnictwo genetyczne i przeprowadzenie poszerzonej diagnostyki w kierunku trombofilii wśród członków rodziny pacjenta, u którego zdiagnozowano wrodzony niedobór jednego z białek antykoagulacyjnych.

Źródła finansowania

Artykuł powstał dzięki wsparciu finansowemu *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego, nr projektu K/ZDS/002936.

Piśmiennictwo

- Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A. i wsp. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 1026–1033.
- Patnaik M., Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008; 14: 1229–1239.
- Milio G., Siragusa S., Malato A., Grimaudo S., Pinto A. Superficial venous thrombosis: role of inherited deficiency of natural anticoagulants in extension to deep veins. *Int. Angiol.* 2009; 28: 298–302.
- Martinez H.R., Rangel-Guerra R.A., Marfil L.J. Ischemic stroke due to deficiency of coagulation inhibitors. Report of 10 young adults. *Stroke* 1993; 24: 19–25.
- Roldán V., Ordoñez A., Marín F. i wsp. Antithrombin Cambridge II (A384S) supports a role for antithrombin deficiency in arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2009; 101: 483–486.
- Mackie I., Cooper P., Lawrie A. i wsp. British Committee for Standards in Haematology: Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int. J. Lab. Hematol.* 2013; 35: 1–13.
- Piazza G. Thrombophilia testing, recurrent thrombosis, and women's health. *Circulation* 2014; 130: 283–287.
- Kyrle PA. Venous thrombosis: who should be screened for thrombophilia in 2014? *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2014; 124: 65–69.
- Wiedermann C.J., Romisch J. The anti-inflammatory actions of antithrombin: a review. *Acta Med. Austriaca* 2002; 29: 89–92.
- Guerrero J., Teruel R., Martínez C. i wsp. Protective role of antithrombin in mouse models of liver injury. *J. Hepatol.* 2012; 57: 980–986.
- Perry D.J., Carrell R.W. Molecular genetics of human antithrombin deficiency. *Hum. Mutat.* 1996; 7: 7–22.
- Olson S., Richard B., Izaguirre G., Schedin-Weiss S., Gettins P.G. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010; 92: 1587–1596.
- McCoy A.J., Pei X.Y., Sinner R., Abrahams J.P., Carrell R.W. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on heparin affinity and activity. *J. Mol. Biol.* 2003; 326: 823–833.
- Maclean P.S., Tait R.C. Hereditary and acquired antithrombin deficiency: epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 2007; 67: 1429–1240.
- Lane D.A., Kunz G., Olds R.J., Thein S.L. Molecular genetics of antithrombin deficiency. *Blood Rev.* 1996; 10: 59–74.
- Kuhle S., Lane D.A., Jochmanns K. i wsp. Homozygous antithrombin deficiency type II (99 Leu to Phe mutation) and childhood thromboembolism. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 1007–1011.
- Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1965; 13: 516–530.
- Tait R.C., Walker I.D., Perry D.J. i wsp. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br. J. Haematol.* 1994; 87: 106–112.
- Melissari E., Monte G., Lindo V.S. i wsp. Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1992; 3: 749–758.
- Khor B., Van Cott E. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *Am. J. Hematol.* 2010; 85: 947–950.
- Kottke-Marchant C., Duncan A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2002; 126: 1326–1336.
- Raszeja-Szpecht A. Metody badań układu hemostazy. W: Jas-trzębska M. (red.). *Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie*. Oinpharma, Warszawa 2009: 92–140.
- Bohner J., von Pape K.W., Blaurock M. Thrombin-based antithrombin assay show overestimation of antithrombin III activity in patients on heparin therapy due to heparin cofactor II influence. *Thromb. Haemost.* 1994; 71: 280–283.
- Johnson N., Khor B., Van Cott E.M. Advances in laboratory testing for thrombophilia. *Am. J. Hematol.* 2012; 87: 108–112.
- Ungerstedt J.S., Schulman S., Egeberg N., Antovic J., Blombäck N. Discrepancy between antithrombin activity methods revealed in Antithrombin Stockholm: do factor Xa-based methods overestimate antithrombin activity in some patient? *Blood* 2002; 99: 2271–2272.
- Corral J., Hernandez-Espinosa D., Soria J.M. i wsp. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109: 4258–4263.
- Kristensen S., Brasmussen B., Pederden S., Bathum L. Detecting antithrombin deficiency may be a difficult task—more than one test is necessary. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 617–618.
- Rossi E., Chiusolo P., Za T. i wsp. Report of a novel kindred with antithrombin heparin-binding site variant (47 Arg to His): demand for automated progressive antithrombin assay to detect molecular variants with low thrombotic risk. *Thromb. Haemost.* 2007; 98: 695–697.
- Bayston T.A., Tripodi A., Mannucci P.M. i wsp. Familial overexpression of beta antithrombin caused by an Asn135Thr substitution. *Blood* 1999; 93: 4242–4247.
- De la Morena-Barrio M.E., Sevivas T.S., Martinez-Martinez I. i wsp. Congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) in a patient with antithrombin deficiency and severe thrombophilia. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10: 2625–2627.

31. Ng P.C., Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3812–3814.
32. Łączmańska I., Łączmański Ł. Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. *Post. Biol. Kom.* 2009; 4: 555–563.
33. Caspers M., Pavlova A., Driesen J. i wsp. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S — practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb. Haemost.* 2012; 108: 247–257.
34. Danese S., Vetrano S., Zhang L., Poplis V.A., Castellino F.J. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115: 1121–1130.
35. Esmon N., DeBault L., Esmon C. Proteolytic formation and properties of γ -carboxyglutamic acid-domain less protein C. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 5548–5553.
36. Taylor F., Peer G., Lockhart M., Ferrell G., Esmon C.T. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001; 97: 1685–1688.
37. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1525–1534.
38. de Fouw N., Haverkate F., Bertina R. Protein C and fibrinolysis: a link between coagulation and fibrinolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; 281: 235–243.
39. Taylor F., Lockhart M. A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releasate from mononuclear leukocytes-platelet suspensions stimulated by phorbol diester. *Thromb. Res.* 1985; 37: 639–649.
40. Dahlbäck B., Villoutreix B. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1311–1320.
41. Mosnier L., Zlokovic B., Griffin J. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109: 3161–3172.
42. Griffin J., Zlokovic B., Mosnier L. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int. J. Hematol.* 2012; 95: 333–345.
43. Berezcky Z., Kovács K.B., Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010; 48: 53–66.
44. Goldenberg N.A., Manco-Johnson M.J. Protein C deficiency. *Haemophilia* 2008; 14: 1214–1221.
45. Estelles A., García-Plaza I., Dasi A. i wsp. Severe inherited “homozygous” protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb. Haemost.* 1984; 52: 53–56.
46. Griffin J.H., Evatt B., Zimmerman T.S., Kleiss A.J., Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.* 1981; 68: 1370–1373.
47. Whitlatch N.L., Ortel T.L. Thrombophilias: when should we test and how does it help? *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 29: 25–39.
48. Khor B., Van Cott E. Laboratory tests for protein C deficiency. *Am. J. Hematol.* 2010; 85: 440–442.
49. Tripodi A., Mannucci P. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin. Chem.* 2001; 47: 1597–1606.
50. Faioni E., Hermida J., Rovida E. i wsp. Type II protein C deficiency: identification and molecular modelling of two natural mutants with low anticoagulant and normal amidolytic activity. *Br. J. Haematol.* 2000; 108: 265–271.
51. Dahlback B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 12022–12027.
52. Maurissen L., Thomassen M., Nicolaes G. i wsp. Reevaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated protein C-catalyzed factor Va-inactivation. *Blood* 2008; 6: 3034–3041.
53. Heeb M., Mesters R., Tans G., Rosing J., Griffin J.H. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 2872–2877.
54. Koppelman S., Hackeng T., Sixma J., Bouma B.N. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* 1995; 86: 1062–1071.
55. Mosnier L., Meijers J., Bouma B. The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and regulation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 1040–1046.
56. Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br. J. Haematol.* 2001; 114: 512–528.
57. Comp P.C., Esmon C.T. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311: 1525–1528.
58. García de Frutos P., Fuentes-Prior P., Hurtado B., Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb. Haemost.* 2007; 98: 543–556.
59. Marlar R., Gausman J. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am. J. Hematol.* 2011; 86: 418–421.
60. Ballard R., Marques M. Pathology consultation on the laboratory evaluation of thrombophilia: when, how, and why. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012; 137: 553–560.
61. Marlar R., Potts R., Welsh C. Accuracy of diagnosis of protein S deficiency by protein S activity and antigen assays. *J. Clin. Ligand* 2005; 28: 130–135.
62. Castoldi E., Hackeng T. Regulation of coagulation by protein S. *Curr. Opin. Hematol.* 2008; 15: 529–536.
63. Lind-Halldén C., Dahlen A., Hillarp A. i wsp. Small and large PROS1 deletions but no other types of rearrangements detected in patients with protein S deficiency. *Thromb. Haemost.* 2012; 108: 94–100.
64. ten Kate M.K., van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 2008; 14: 1222–1228.
65. Zawilska K., Bala M., Błędowski P. i wsp. Polskie wytyczne profilaktyki i leczenia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej: aktualizacja 2012. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2012; 122 (supl. 2): 3–74.
66. Wypasek E., Potaczek D.P., Alhenc-Gelas M., Alhenc-Gelas M., Undas A. PROS1 mutations associated with protein S deficiency in Polish patients with residual vein obstruction on rivaroxaban therapy. *Thromb. Res.* 2014; 134: 199–201.
67. Celinska-Lowenhoff M., Iwaniec T., Alhenc-Gelas M., Musial J., Undas A. Arterial and venous thrombosis and prothrombotic fibrin clot phenotype in a Polish family with type I antithrombin deficiency (antithrombin Krakow). *Thromb. Haemost.* 2011; 106: 379–381.
68. Odnoczko E., Vertun-Baranowska B., Buczma A. i wsp. Podłoże genetyczne wrodzonego niedoboru antytrombiny w 18 polskich rodzinach. *Acta Haematol. Pol.* 2011; 42: 519–524.
69. Celinska-Löwenhoff M., Iwaniec T., Alhenc-Gelas M., Musial J., Undas A. Antithrombin Krakow II (c.624+1 G>T): a novel mutation leading to type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2012; 23: 454–455.
70. Szymańska M., Alhenc-Gelas M., Undas A. Recurrent ischemic cerebrovascular events in a patient with type I antithrombin de-

- ficiency caused by 9788 G>A splice site mutation: a case report. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2013; 24: 213–215.
71. Szymańska M., Alhenc-Gelas M., Undas A. Antithrombin Rybnik: a new point mutation (nt 683 G>T) associated with type I antithrombin deficiency in a patient with venous thromboembolism and recurrent superficial venous thrombosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2013; 24: 579–580.
 72. Cieśla M., Wypasek E., Corral J., Alhenc-Gelas M., Undas A. Antithrombin Katowice: exon 1 deletion in the SERPINC1 gene associated with type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2014 Jul 31 [w druku].
 73. Wypasek E., Pankiw-Bembenek O., Potaczek D.P. i wsp. A missense mutation G109R in the PROC gene associated with type I protein C deficiency in a young Polish man with acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167: 146–148.
 74. Wypasek E., Potaczek D.P., Alhenc-Gelas M., Undas A. Novel missense mutation C106R in the PROC gene associated with type I protein C deficiency in a young Polish man with high-risk pulmonary embolism. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2014; 124: 75–76.
 75. Wypasek E., Alhenc-Gelas M., Undas A. First report of a large PROS1 deletion from exon 1 through 12 detected in Polish patients with deep-vein thrombosis. *Thromb. Res.* 2013; 132: 143–144.
 76. Wypasek E., Potaczek D.P., Alhenc-Gelas M., Undas A. Heerlen polymorphism associated with type III protein S deficiency and factor V Leiden mutation in a Polish patient with deep vein thrombosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2014; 25: 84–85.
 77. Wypasek E., Potaczek D.P., Płonka J., Alhenc-Gelas M., Undas A. Protein S deficiency and Heerlen polymorphism in a Polish patient with acute myocardial infarction and previous venous thromboembolism. *Thromb. Res.* 2013; 132: 776–777.