

Układ antykoagulacyjny białka C w ostrych białaczkach

Protein C anticoagulant system in acute leukaemias

Marzenna Galar, Jarosław Piszcz, Anna Szumowska, Łukasz Bołkun, Janusz Kłoczko

STRESZCZENIE

Rozwojowi ostrych białaczek już w momencie diagnozy towarzyszy subkliniczna aktywacja krzepnięcia. Zaburzenia hemostazy, wynikające m.in. z uszkodzenia śródbłonna i osłabionej funkcji syntetycznej wątroby, nie zawsze manifestują się jawną skazą krwotoczną lub chorobą zakrzepową. Wydolność mechanizmów kompensacyjnych – na poziomie układu antykoagulacyjnego białka C – zapewnia równowagę hemostatyczną między czynnikami prozakrzepowymi i prokrwotocznymi.

Badaniami objęto 20 chorych z nowo rozpoznanymi ostrymi białaczkami. W początkowym okresie rozwoju choroby obserwowano obniżenie stężeń antykoagulacyjnych białek syntezowanych w wątrobie (PC, PS) oraz wzrost sTM i znaczne obniżenie sEPCR – białkowych markerów uszkodzenia śródbłonna naczyń.

Słowa kluczowe: ostre białaczki, białko C, białko S, trombomodulina, śródbłonkowy receptor białka C

SUMMARY

Acute leukaemias development is connected with subclinical activation of coagulation. Haemostatic disturbances – as a result of endothelium damage and/or impaired synthetic function of the liver – not always manifest as an overt haemorrhage or thrombotic disease. Compensatory mechanisms competence, in so far as it affect protein C anticoagulant system, assures haemostatic balance between prothrombotic and pro-haemorrhage factors.

Investigation was performed in 20 newly diagnosed patients with acute leukaemias. At the moment of diagnosis, plasma concentrations decrease of anticoagulation proteins, synthesised by the liver was observed. There was also noted an increase of sTM and significant decrease of sEPCR concentrations – markers of endothelial damage.

Keywords: Acute leukaemias, Protein C, Protein S, Thrombomodulin, Endothelial cell protein C receptor

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 8.12.2011
Zaakceptowano do druku: 2.04.2012

Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego
w Białymstoku
Kierownik: Prof. dr hab. med. Janusz Kłoczko

Adres do korespondencji:
Marzenna Galar
Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego
w Białymstoku
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok
tel. (85)7468603
e-mail: galarm@poczta.onet.pl

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (1): 83–86

Wstęp

Układ antykoagulacyjny białka C zapewnia właściwą i skuteczną wewnątrznacyniową kontrolę krzepnięcia krwi. System ten obejmuje czynniki krążące w osoczu – białko C (PC), białko S (PS), jak i występujące w formach endotelialnej i rozpuszczalnej – trombomodulina (TM) oraz śródbłonkowy receptor białka C (EPCR). Działanie układu inicjowane jest poprzez wiązanie trombiny ze śródbłonkowym białkiem trombomoduliną. W obecności śródbłonkowych i osoczowych kofaktorów powstaje aktywne białko C (APC) o właściwościach antykoagulacyjnych [1]. Składowe układu białka C tworzą złożone, wielkocząsteczkowe kompleksy, których funkcje niejednokrotnie wykraczają poza hemostazę osoczną [2].

Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego związane są z wysokim ryzykiem powikłań zakrzepowych oraz krwawień [3]. Etiologia tych zaburzeń w przebiegu ostrych białaczek jest złożona i zróżnicowana w zależności od rodzaju białaczki oraz fazy leczenia. Rozwojowi ostrych białaczek już w momencie diagnozy towarzyszy subkliniczna aktywacja krzepnięcia, która może ujawnić się zespołem objawów związanych z rozsianym wykrzepianiem śródnacyniowym (DIC). Obraz kliniczny jest zróżnicowany – od zlokalizowanych żylnie i/lub tętniczo zakrzepów, po rozsiane zagrażające życiu krwawienia [4]. Stałe czynniki odpowiedzialne za rozwój krwawień u chorych na ostre białaczki to małopłytkowość, uszkodzenie ściany naczyń krwionośnych, osłabienie funkcji wątroby, aktywacja

fibrynolizy, DIC, stosowane leczenie cytostatyczne oraz towarzyszące stany chorobowe. Do czynników biorących udział w patogenezie powikłań zakrzepowych należą prokoagulacyjne właściwości komórek blastycznych, zaburzenia przepływu naczyniowego, obecność cewników naczyniowych, stosowane leczenie przeciwnowotworowe, infekcje, wrodzona trombofilia oraz długotrwała hospitalizacja [5]. Defekty układu białka C stanowią jedną z głównych przyczyn zakrzepicy w populacji ogólnej, co podkreśla istotną rolę układu w regulowaniu krzepnięcia krwi [6]. W patogenezie obserwowanych powikłań w przebiegu ostrych białaczek udział mają zmiany stężeń białek antykoagulacyjnych (PC, PS, TM, EPCR). W momencie rozpoznania choroby w głównej mierze są skutkiem uszkodzenia wątroby przez nacieki białaczkowe oraz zaburzeń w funkcjonowaniu śródbłonna [4].

Celem pracy jest ocena parametrów układu białka C w rozpoznanych *de novo* ostrych białaczkach szpikowych i limfoblastycznych.

Materiał i metody

Badaniami objęto 20 pacjentów z nowo rozpoznanymi ostrymi białaczkami, w tym: 13 z ostrą białaczką szpikową (*acute myeloblastic leukaemia*; AML), z wyłączeniem AML-M3, oraz 7 z ostrą białaczką limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukaemia*; ALL), hospitalizowanych w Klinice Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Grupę badaną stanowiło 9 kobiet oraz 11 mężczyzn w wieku 22–88 lat (mediana 55 lat). Rozpoznanie choroby ustalono na

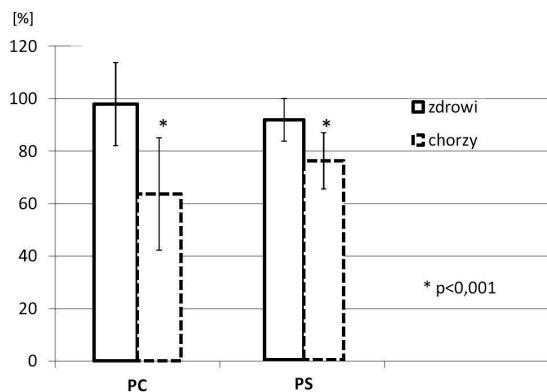
podstawie wyników badania podmiotowego, przedmiotowego oraz rutynowych badań laboratoryjnych obejmujących morfologię krwi obwodowej, ocenę mielogramu, badanie cytochemiczne, immunofenotypowanie, badania cytogenetyczne, jak również badania oceniające funkcje wątroby (ASPAT, ALAT) oraz rutynowe badania z zakresu hemostazy (PT, APTT). Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników (10 kobiet, 10 mężczyzn) w zbliżonym przedziale wieku – od 28 do 79 lat, mediana 53,5 roku.

Od wszystkich osób chorych i zdrowych krew do badań pobierano rano, na czczo, z żyły łokciowej bez ucisku żylnego, do 3,8% roztworu cytrynianu sodu w stosunku objętościowym 9:1. Bezpośrednio po pobraniu krew wirowano przez 15 minut przy 1500 g w temperaturze pokojowej w celu otrzymania osocza ubogopłytkowego, które przechowywano w temperaturze -75°C do chwili wykonania badań.

W badanych osoczach oznaczano stężenia białka C, całkowitego białka S oraz rozpuszczalnych form trombomoduliny (sTM) i śródbłonkowego receptora białka C (sEPCR) metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu komercyjnych zestawów ASSERACHROM firmy Diagnostica Stago.

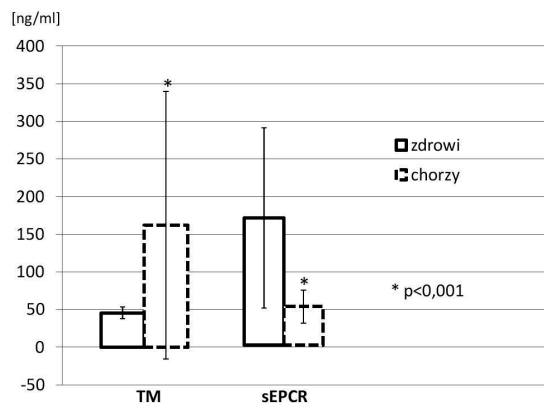
Wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu pakietu STATISTICA 8.0, za istotne statystycznie uznając wartości $p < 0,05$.

Praca była realizowana w ramach projektu statutowego nr 3-52588. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMB. Wszyscy – pacjenci i osoby zdrowe – wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniach.



Ryc. 1. Osocze stężenia białka C (PC) i całkowitego białka S (PS) u chorych na ostre białaczki mielo- i limfoblastyczne (AML, ALL; n=20) w porównaniu z grupą osób zdrowych (n=20; $p < 0,001$)

Fig. 1. Plasma concentrations of protein C (PC) and total protein S (PS) in patients with acute myelo- and lymphoblastic leukaemias (AML, ALL; n=20) in relation to healthy control (n=20; $p < 0,001$)



Ryc. 2. Osocze stężenia rozpuszczalnych form trombomoduliny (TM) i śródbłonkowego receptora białka C (sEPCR) u chorych na ostre białaczki mielo- i limfoblastyczne (AML, ALL; n=20) w porównaniu z grupą osób zdrowych (n=20; $p < 0,001$)

Fig. 2. Plasma concentrations of thrombomodulin (TM) and endothelial cell protein C receptor (EPCR) in patients with acute myelo- and lymphoblastic leukaemias (AML, ALL; n=20) in relation to healthy control (n=20; $p < 0,001$)

Tabela I. Badane parametry układu antykoagulacyjnego białka C u chorych na ostre białaczki w porównaniu z grupą kontrolną
 Table I. Parameters of protein C anticoagulant system in patients with acute leukaemias in relation to healthy control

Badany parametr	Kontrola (n=20)	AML, ALL (n=20)	p	AML (n=13)	ALL (n=7)	p
PC (%)	98,02±15,85	63,67±21,41	<0,001	60,13±20,34	70,24±23,38	ns
PS (%)	93,18±8,31	77,23±10,91	<0,001	80,12±11,84	71,85±6,68	0,019
TM (ng/ml)	45,38±7,77	161,91±177,69	<0,001	123,44±131,10	233,37±237,53	ns
sEPCR (ng/ml)	164,96±117,06	50,08±21,67	<0,001	41,10±14,87	66,77±23,35	0,008

PC – białko C (*protein C*), PS – białko S (*protein S*), TM – trombomodulina (*thrombomodulin*), sEPCR – śródbłonkowy receptor białka C (*endothelial cell protein C receptor*)

Wyniki

W grupie 20 chorych z nowo rozpoznanymi ostrymi białaczkami stwierdzono znamienne statystycznie obniżenie stężeń białka C (63,67±21,41% vs 98,02±15,85%, $p<0,001$), całkowitego białka S (77,23±10,91% vs 93,18±8,31%, $p<0,001$) oraz rozpuszczalnej formy śródbłonkowego receptora białka C (50,08±21,67 ng/ml vs 164,96±117,06 ng/ml, $p<0,001$) (Ryc. 1, 2). Wykazano istotnie statystycznie wyższe stężenie PS w grupie chorych na ostre białaczki mieloblastyczne w porównaniu z chorymi z ostrymi białaczkami limfoblastycznymi (80,12±11,84% vs 71,85±6,68%, $p=0,019$). Natomiast stężenie sEPCR było istotnie statystycznie wyższe w grupie chorych na ALL w porównaniu z chorymi z AML (66,77±23,35 ng/ml vs 41,10±14,87 ng/ml, $p=0,008$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach PC u chorych na AML i ALL. U chorych na ostre białaczki obserwowano znamienne statystycznie wzrost stężeń osoczowej trombomoduliny (161,91±177,69 ng/ml vs 45,38±7,77 ng/ml, $p<0,001$) (Ryc. 2). Nie wykazano różnic w stężeniach sTM u chorych na AML i ALL.

Wyniki badanych parametrów układu antykoagulacyjnego białka C w ostrych białaczkach przedstawiono w tabeli I.

W grupie chorych na ostre białaczki wykazano wysoki poziom aktywności LDH (3251,89±8153,38 IU/l). Aktywność tego enzymu była znacznie wyższa u chorych z ALL (7042,57±12650 IU/l) niż AML (839,64±734,0 IU/l). Aktywność enzymów wątrobowych mieściła się w granicach wartości prawidłowych (ostre białaczki szpikowe: ASPAT – 35,2±30,6 IU/l, ALAT – 36,5±24,4 IU/l; ostre białaczki limfoblastyczne: ASPAT – 41,0±27,3 IU/l, ALAT – 50,7±32,5 IU/l). Badania hemostazy (PT, APTT) nie wykazywały istotnych zmian poza nieznacznym wydłużeniem czasu protrombinowego w całej grupie ostrych białaczek (PT – 16,5±4,6 sek).

Omówienie

U pacjentów z ostrymi białaczkami występują zaburzenia hemostazy o złożonej etiologii. Obraz kliniczny

przedstawia najczęściej skazę krwotoczną. Zakrzepica jest rzadziej występującym powikłaniem, zazwyczaj towarzyszącym zespołowi DIC. U niektórych pacjentów z ostrymi białaczkami zakrzepica rozwija się pomimo występującej trombocytopenii i przy braku laboratoryjnych dowodów na obecność DIC [3]. Tsunoda i wsp. [7] wykazali związek pomiędzy powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi w ostrych białaczkach a zmianami w poziomie białek antykoagulacyjnych układu białka C. Kluczowym elementem tego układu są witamino-K-zależne białka syntezowane w wątrobie – białko C, które krąży w osoczu w postaci nieaktywnego zymogenu proteazy serynowej, oraz pełniące wobec niego funkcję kofaktorową białko S. PS występuje w osoczu w formie aktywnej (wolnej) oraz w postaci nieaktywnych kompleksów ze składową dopełniacza C4b [1, 8]. Powikłania zakrzepowe obserwowane w chorobach wątroby, zespole DIC, w trakcie leczenia warfaryną mogą być wynikiem wrodzonej bądź nabytej trombofilii związanej z niedoborem białka C [6]. Troy i wsp. [9] wykazali obniżenie poziomu antygenu oraz aktywności białka C u pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną. Spadkowi uległo również stężenie wolnej postaci PS, podczas gdy stężenie całkowitego PS pozostało w normie. Zmiany w poziomie PC i PS nie miały związku z osłabieniem funkcji wątroby ani wzrostem stężenia białka C4b. W ostrej białaczce limfoblastycznej autorzy badania wykazali prawidłowe poziomy białek C i S w porównaniu z osobami zdrowymi. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono spadek stężeń PC oraz całkowitego PS zarówno w AML, jak i w ALL. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez Dixit i wsp. [10], którzy również stwierdzili niskie poziomy PC i PS – odpowiednio u 42,9% i 57,1% badanych pacjentów. Przyczyną w spadku poziomu białek antykoagulacyjnych (PC, PS) upatruje się przede wszystkim w osłabionej funkcji syntetycznej wątroby, jako wyniku zaburzonego przepływu krwi, który prowadzi do uszkodzenia naczyń wątrobowych [11]. DIC jest główną przyczyną koagulopatii występującej w ostrych białaczkach. Rodighiero i wsp. [11] stwierdzili jednak, że w przebiegu zespołu DIC w ostrych białaczkach nie obserwuje się

stałej i znaczącej redukcji osoczowych stężeń PC i AT, co jest charakterystyczne dla innych jednostek chorobowych powikłanych tym zespołem. Zaobserwowali natomiast ścisłą zależność pomiędzy poziomem inhibitorów oraz ich syntezą wątrobową.

Ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu antykoagulacyjnego białka C spełniają komórki śródbłonna, które wykazują czynne działanie przeciwzakrzepowe poprzez wytwarzanie TM, EPCR, tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI₂) [8]. Z tego względu choroby związane z uszkodzeniem naczyń, w tym różnorodne infekcje, posocznica, jak również stan zapalny występujący jako odpowiedź immunologiczna w procesie nowotworowym, zmieniają funkcje układu białka C, m.in. zwiększając stężenie rozpuszczalnej formy trombomoduliny (sTM) [2]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano znaczące, istotne statystycznie zwiększenie stężenia osoczowej trombomoduliny w grupie pacjentów z ostrymi białaczkami, co może świadczyć o toczącym się procesie zapalnym z uszkodzeniem komórek śródbłonna.

Trombomodulina oraz EPCR funkcjonują jako receptory i kofaktory reakcji hamowania krzepnięcia [12, 13]. W warunkach *in vivo* stężenie EPCR jest wyższe w dużych naczyniach, podczas gdy aktywacja białka C poprzez kompleksy trombina-TM zachodzi głównie w mikrokrażeniu [2, 13]. Przypuszczano, że większość procesów aktywujących białko C odbywa się w drobnych naczyniach, z uwagi na wyższe w nich stężenie TM [13]. Ważnym śródbłonkowym aktywatorem antykoagulacyjnego białka C jest EPCR, który znajduje się w pobliżu kompleksu trombina-TM i nasila aktywację PC. Taylor i wsp. [13] wykazali, że przy wysokim stężeniu EPCR, będącym w nadmiarze w stosunku do trombomoduliny, wzrost aktywacji białka C w warunkach *in vivo* jest zależny od stężenia EPCR. Wrodzone bądź nabyte zmiany w poziomie EPCR mogą zatem determinować wystąpienie miejscowych stanów zakrzepowych.

Rozpuszczalna, osoczowa forma EPCR (sEPCR) z tym samym powinowactwem wiąże PC i APC, wykazując efekty działania przeciwne do formy endotelialnej. sEPCR hamuje antykoagulacyjną aktywność APC, nasila odpowiedź zapalną oraz interferuje z działaniem ochronnym endotelialnego EPCR [2]. W przeprowadzonych badaniach wykazano istotny spadek stężeń sEPCR u chorych na ostre białaczki. Być może jest to wynikiem obniżonej ekspresji endotelialnej formy EPCR, a w następstwie zmniejszonego uwalniania do osocza. Wyższe stężenia sEPCR w ALL niż w AML mogą przynajmniej w części odpowiadać za większą skłonność do zakrzepicy w ostrej białaczce limfoblastycznej.

Obniżenie stężeń białek antykoagulacyjnych (PC, PS) oraz wzrost stężeń sTM, prowadzące do nadkrze-

pliwości, kompensowane są spadkiem stężeń sEPCR u chorych na ostre białaczki.

Wnioski

U pacjentów z nowo rozpoznanymi ostrymi białaczkami obserwuje się obniżone stężenia białek syntezowanych w wątrobie (PC, PS). Towarzyszy temu wzrost sTM oraz obniżenie sEPCR – białek wskazujących na uszkodzenie śródbłonna naczyń. Współistnienie zmian prozakrzepowych i prokrwotocznych zapewnia utrzymanie względnej równowagi hemostatycznej w początkowym etapie rozwoju choroby.

Piśmiennictwo

- Dahlbäck B, Villoutreix O. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2003;1:1525-1534.
- Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-Protein C-EPCR system integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1374-1383.
- Kwaan HC. Double hazard of thrombophilia and bleeding in leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:151-157.
- Rickles FR, Falanga A, Montesinos P, Sanz MA, Brenner B, Barbui T. Bleeding and thrombosis in acute leukemia: What does the future of therapy look like? *Thromb Res* 2007;120(Suppl 2):99-106.
- Kłoczko J. Problemy zaburzeń hemostazy w ostrych białaczkach. *Acta Haematol Pol* 2008;39:661-666.
- Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008;112:19-27.
- Tsumita Y, Matsushima T, Uchiumi H. Acute myeloid leukemia accompanied by multiple thrombophlebitis. *Internal Medicine* 1997;36:595-597.
- Golański JA. Struktura i funkcje układu hemostazy. Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie. Red., Jastrzębska M. Ośrodek Informacji Naukowej ONIPHARMA. Warszawa 2009; s. 15-91.
- Troy K, Essex D, Rand J, Lema M, Cuttner J. Protein C and S levels in acute leukemia. *Am J Hematol* 1991;37:159-162.
- Dixit A, Kannan M, Mahapatra M, Choudhry VP, Saxena R. Roles of protein C, protein S and antithrombin III in acute leukemia. *Am J Hematol* 2006;81:171-174.
- Rodeghiero F, Mannucci PM, Viganò S, et al. Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukemia. *Blood* 1984;63:965-969.
- Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2003;1:1515-1524.
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* 2001;97:1685-1688.