

Dawid Szpecht

**UKŁAD BIAŁKA C
(BIAŁKO C, BIAŁKO S, TROMBOMODULINA)
U DZIECI PODDANYCH ALLOGENICZNEJ
TRANSPLANTACJI KOMÓREK
KRWIOTWÓRCZYCH**

Rozprawa doktorska zrealizowana w ramach grantu
promotorskiego N407 058737

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Wachowiak

II Katedra Pediatrii
Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Jacek Wachowiak

Poznań 2011

*Pracę dedykuję Siostrze – Sylwii,
za niezwykle dzielną i godną podziwu walkę
z chorobą nowotworową*

*Życie dają Rodzice,
radość i wsparcie daje Żona,
a sens wszystkiemu, co robimy nadają Dzieci.
Dziękuję Wam.*

Podziękowania

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Jackowi Wachowiakowi pragnę podziękować z całego serca za poświęcony mi czas oraz okazaną pomoc w realizacji badań naukowych, a także za stworzenie mi doskonałych możliwości rozwoju.

Pani Profesor dr hab. n. med. Krystynie Zawilskiej oraz Jej Zespołowi: Jolancie Kurosz, Aleksandrze Redgos oraz Jerzemu Jaworskiemu za okazaną ogromną życzliwość, a przede wszystkim za pomoc i współpracę w dziedzinie badań nad układem białka C.

Kolegom z Oddziału Transplantacji Szpiku za stworzenie warunków do przygotowania tej pracy.

Pielęgniarkom Oddziału Transplantacji Szpiku, dziękuję za okazaną pomoc przy realizacji części analitycznej pracy.

Mojej Żonie - Karolinie, córeczce - Laurze oraz całej mojej Rodzinie dziękuję za wyjątkową cierpliwość i zrozumienie.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów używanych w pracy	8
1. WSTĘP	14
1.1. Definicje i podstawy procedury transplantacji komórek krwiotwórczych.....	14
1.2. Wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych	19
1.3. Kondycjonowanie przed transplantacją komórek krwiotwórczych.....	22
1.3.1. Napromienienie całego ciała.....	22
1.3.2. Chemioterapia mieloablacyjna.....	23
1.4. Kaskada krzepnięcia.....	26
1.4.1. Zewnątrz- wewnątrzpochodna droga krzepnięcia.....	26
1.4.2. Układ białka C.....	29
1.4.3. Oporność na aktywowane białko C, mutacja genu czynnika V.....	31
1.5. Wybrane wczesne powikłania transplantacji komórek krwiotwórczych	34
1.5.1. Zespół okluzji naczyń żylnych (VOD)	35
1.5.2. Mikroangiopatia skojarzona z HSCT (TAM).....	37
1.5.3. Zespół przesiąkania włóściczek (CLS).....	38
1.5.4. Powikłania infekcyjne.....	38
1.5.5. Zespół niewydolności wielonarządowej (MODS).....	41
1.6. Przyczyny niepowodzeń transplantacji komórek krwiotwórczych u dzieci i młodzieży.....	42
2. CEL PRACY	44
3. PACJENCI I METODY	45
3.1. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych	45
3.1.1. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego.....	45
3.1.2. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych z chorobami nierozrostowymi.....	47
3.2. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna stosowana przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych.....	49
3.2.1. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna u biorców z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego.....	49
3.2.2. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna u biorców z chorobami nierozrostowymi układu krwiotwórczego.....	55

3.3. Kryteria oceny przyjęcia przeszczepu i rekonstrukcji krwiotworzenia.....	56
3.4. Profilaktyka, rozpoznawanie oraz występowanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) w badanej grupie	57
3.4.1. Profilaktyka GvHD.....	57
3.4.2. Rozpoznawanie aGvHD.....	60
3.4.3. Występowanie aGvHD	61
3.5. Zapobieganie, rozpoznawanie, i leczenie wczesnych powikłań związanych z toksycznością narządową procedury transplantacyjnej oraz uszkodzeniem śródbłonnków.....	63
3.5.1. Zapobieganie oraz klasyfikacja toksyczno-zapalnego uszkodzenia błon śluzowych jamy ustnej i przewodu pokarmowego oraz jego następstw.....	63
3.5.2. Zapobieganie nudnościom i wymiotom.....	64
3.5.3. Zapobieganie krwotocznemu zapaleniu pęcherza moczowego.....	64
3.5.4. Zapobieganie, rozpoznawanie, leczenie i występowanie VOD w badanej grupie.....	64
3.5.5. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie TAM w badanej grupie.....	66
3.5.6. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie CLS w badanej grupie.....	69
3.6. Zapobieganie, rozpoznawanie i leczenie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	71
3.6.1. Zapobieganie powikłaniom infekcyjnym po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	71
3.6.2. Rozpoznawanie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych	72
3.6.3. Leczenie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	74
3.6.4. Występowanie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych w badanej grupie.....	76
3.7. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie MODS w badanej grupie.....	77
3.8. Postępowanie wspomagające.....	80
3.8.1. Cewnik centralny.....	80
3.8.2. Żywienie doustne i dożylne.....	81
3.8.3. Stosowanie preparatów krwiopochodnych.....	81
3.8.4. Zwalczanie bólu.....	81

3.9. Charakterystyka grupy kontrolnej.....	82
3.10. Metody badań układu białka C.....	84
3.10.1. Metoda oznaczania aktywności białka C.....	85
3.10.2. Metoda oznaczania stężenia wolnego białka S.....	86
3.10.3. Metoda oznaczania stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny.....	89
3.10.4. Metoda oznaczania oporności na aktywowane białko C (APCR).....	91
3.11. Metoda oznaczania mutacji genu czynnika V.....	92
3.12. Charakterystyka i zasady kwalifikacji dawców szpiku.....	93
3.13. Zgoda na przeprowadzenie badań.....	95
3.14. Analiza statystyczna.....	95
4. WYNIKI.....	97
4.1. Białko C.....	97
4.1.1. Aktywność białka C w osoczu w grupie kontrolnej.....	97
4.1.2. Aktywność białka C w osoczu w grupie badanej.....	98
4.1.3. Aktywność białka C w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi.....	102
4.1.4. Aktywność białka C w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonek.....	104
4.1.5. Aktywność białka C w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	105
4.2. Białko S.....	108
4.2.1. Stężenie wolnego białka S w osoczu w grupie kontrolnej.....	108
4.2.2. Stężenie wolnego białka S w osoczu w grupie badanej.....	110
4.2.3. Stężenie wolnego białka S w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi.....	113
4.2.4. Stężenie wolnego białka S w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonek.....	115
4.2.5. Stężenie wolnego białka S w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	117
4.3. Trombomodulina.....	120
4.3.1. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w grupie kontrolnej.....	120
4.3.2. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w grupie badanej.....	122

4.3.3. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi.....	125
4.3.4. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonnków.....	126
4.3.5. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych.....	128
4.4. Ocena korelacji profili aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu u dzieci.....	131
4.5. Oporność na aktywowane białko C, mutacja genu czynnika V (Leiden).....	132
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	134
5.1. Białko C, oporność na aktywowane białko C.....	134
5.2. Białko S.....	149
5.3. Trombomodulina.....	153
6. WNIOSKI.....	159
7. STRESZCZENIE.....	161
8. SUMMARY.....	166
9. PIŚMIENNICTWO.....	172
10. PUBLIKACJE WŁASNE.....	194

Wykaz skrótów używanych w pracy

ADDRESS	(Administration of Drotrecogin Alfa (activated) in Early Stage Severe Sepsis)
ADV	(adenovirus) - adenowirus
aGvHD	(acute graft-versus-host disease) – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
ALD	(adrenoleukodystrophy) - adrenoleukodystrofia
ALL	(acute lymphoblastic leukemia) – ostra białaczka limfoblastyczna
ALL-HR	(high risk acute lymphoblastic leukemia) – ostra białaczka limfoblastyczna wysokiego ryzyka
allo-HSCT	(allogeneic HSCT) – allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych
AML	(acute myeloid leukemia) – ostra białaczka szpikowa
ANC	(absolute neutrophils count) – liczba granulocytów obojętnochłonnych
APC	(activated protein C) – aktywowane białko C
APCr	(activated protein C resistance) – oporność na aktywowane białko C
APROCCHS	(Activated Protein C and Corticosteroids for Human Septic Shock)
α1- AT	(α 1 – antitrypsin) - α 1 – antytyrypsyna
AT III	(antithrombin III) - antytrombina III
ATG	(anti-thymocyte globulin) – globulina przeciwtymocytarna
BAL	(biphenotypic acute leukemia) – ostra białaczka bifenotypowa
BM	(bone marrow) – szpik kostny
BMT	(bone marrow transplantation) – transplantacja szpiku kostnego
Bu	(busulphan) - busulfan

CB	(cord blood) – krew pępowinowa
CLS	(capillary leak syndrome) – zespół przesiąkania włośniczek
CML	(chronic myelocytic leukemia) – przewlekła białaczka szpikowa
CMV	(cytomegalovirus) – wirus cytomegalii
CO	(clinical option) - wykonywane w ramach kontrolowanych protokołów klinicznych
CP	(chronic phase) – faza przewlekła CML
CR	(complete remission) – remisja całkowita
CRP	(C reactive protein) – białko C reaktywne
CsA	(cyclosporin A) – cyklosporyna A
Cy	(cyclophosphamid) – cyklofosfamid
D	(developmental) - eksperymentalne
EBMT	(European Group for Blood and Marrow Transplantation) – Europejska Grupa ds. Transplantacji Komórek Krwiotwórczych z Krwi i Szpiku
EBV	(Epstein-Barr virus) – wirus Epsteina-Barr
EGF	(epidermal growth factor) – naskórkowy czynnik wzrostu
ELISA	(enzyme-linked immunosorbent assay)
F	(female) - płeć żeńska
FA	(Fanconi anemia) – niedokrwistość Fanconiego
Flu	(fludarabine) - fludarabina
FTBI	(fractionated total body irradiation) – frakcjonowane napromienianie całego ciała
FUO	(fever of unknown origin) - gorączka niewiadomego pochodzenia
G-CSF	(granulocyte colony-stimulating factor) – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnych

GvHD	(graft-versus-host disease) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
GvLR	(graft-versus-leukemia reaction) – reakcja przeszczep przeciwko białaczce
HD	(Hodgkin's disease) – choroba Hodgkina
HLA	(human leukocyte antigens) – główny układ zgodności tkankowej człowieka
HSC	(hematopoietic stem cells) – macierzyste komórki krwiotwórcze
HSCT	(hematopoietic stem cell transplantation) – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych
IBMTR	(International Bone Marrow Transplantation Registry) – Międzynarodowy Rejestr Transplantacji Szpiku Kostnego
ICAM-1	(intracellular adhesion molecule 1) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1
IIP	(idiopathic interstitial pneumonia) – idiopatyczne śródmiąższowe zapalenie płuc
M	(male) - płeć męska
MAPKs	(mitogen-activated protein kinase) - kinaza aktywowana mitogenem
MD	(matched donor) – dawca niespokrewniony lub rodzinny zgodny w 10/10 lub 9/10 alleli w 5 <i>loci</i>
MDS	(myelodysplastic syndrome) – zespół mielodysplastyczny
Mel	(melphalan) – melfalan
MMD	(mismatched donor) – częściowo niezgodny dawca niespokrewniony lub rodzinny, tj. zgodny w mniej niż 9/10 alleli w 5 <i>loci</i>

MMF	(mycophenolan mofetil) – mykofenolan mofetilu
MODS	(multiple-organ dysfunction syndrome) – zespół niewydolności wielonarządowej
MSD	(matched sibling donor) – rodzeństwo zgodne w układzie HLA
MSD-HSCT	(matched sibling donor HSCT) – transplantacja komórek krwiotwórczych od zgodnego rodzeństwa
MTX	(methotrexate) - metotreksat
NHL	(non-Hodgkin's lymphoma) – chłoniak nieziarniczny
NS	brak znamienności statystycznej
NT	nie badano
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAI	(inhibitor of tissue plasminogen activator) - inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu
PAR-1	(protease activated receptor-1) - receptor aktywowany przez proteazę 1
PB	(peripheral blood) – krew obwodowa
PC	(protein C) – białko C
PCI	(inhibitor of protein C) – inhibitor białka C
PCR	(polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy
PCT	(procalcitonin) - prokalcytonina
PS	(protein S) – białko S
PBSC	(peripheral blood stem cells) – komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej
PICU	(pediatric intensive care unit) – pediatryczne oddziały intensywnej terapii
PLT	(platelets) - płytki krwi

prep-reg	(preparative regimen for HSCT) – mieloablacyjno-immunosupresyjne postępowanie przygotowawcze poprzedzające HSCT, tzw. kondycjonowanie
PRISM	(pediatric risk of mortality score) – skala do oceny rokowania dzieci po allo-HSCT, wymagających hospitalizacji w oddziale intensywnej terapii
PROWESS	(Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis)
PPGdsTKK	Polska Pediatria Grupa ds. Transplantacji Komórek Krwiotwórczych
PTLD	(posttransplant lymphoproliferative disorder) – potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna
RESOLVE	(Researching Severe Sepsis and Organ Dysfunction in Children: A Global Perspective)
RET	retikulocyty
RFLP	(restriction fragments length polymorphism) - analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
rHuG-CSF	(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) - rekombinowany czynnik wzrostu kolonii granulocytarnych
RIC	(reduced intensity conditioning, RIC) - kondycjonowanie o zredukowanej intensywności
S	(standard) - standardowe
SAA	(severe aplastic anemia) – ciężka nabyta niedokrwistość aplastyczna
sAML	(secondary AML) – wtórna ostra białaczka szpikowa
SHBG	(sex hormon binding globulin) – białko wiążące hormony płciowe
sTM	(soluble thrombomodulin) – rozpuszczalna trombomodulina
TAFI	(thrombin activatable fibrynolysis inhibitor) - inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę

TAM	(transplantation-associated microangiopathy) – mikroangiopatia skojarzona z HSCT
TF	(tissue factor) – czynnik tkankowy
TM	(thrombomodulin) - trombomodulina
TNF	(tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworów
t-PA	(tissue plasminogen activator) – tkankowy aktywator plazminogenu
TRS	(treosulphan) - treosulfan
TRM	(transplant related mortality) – śmiertelność związana z procedurą transplantacyjną
TSR	(thrombin sensitive region) – region wrażliwy na trombinę
TT	(tiotepa) - tiotepa
TTP	(thrombotic thrombocytopenic purpura) – zakrzepowa plamica małopłytkowa
UD	(unrelated donor) – niespokrewniony dawca
MUD-HSCT	(matched unrelated donor HSCT) – HSCT od fenotypowo zgodnego dawcy niespokrewnionego
UL vWF	(unusually large von Willebrand factor) – czynnik von Willebranda nieprawidłowej wielkości
VCAM-1	(vascular cell adhesion molecule 1) – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłónka 1
vWF	(von Willebrand factor) – czynnik von Willebranda
VOD	(veno-occlusive disease) – zespół okluzji naczyń żylnych
VP-16	(etoposide) - etopozyd
WBC	(white blood cells count) – liczba krwinek białych we krwi obwodowej
XPRESS	(Xigris and Prophylactic Heparin Evaluation in Severe Sepsis)

1. WSTĘP

1.1 Definicje i podstawy procedury transplantacji komórek krwiotwórczych

1.1.1. Definicja transplantacji komórek krwiotwórczych

Transplantacja komórek krwiotwórczych (*ang. hematopoietic stem cell transplantation; HSCT*) oznacza każdą procedurę, w której komórki krwiotwórcze, niezależnie od typu ich dawcy oraz ich źródła, zostają przetoczone odpowiednio przygotowanemu biorcy w celu całkowitej lub częściowej wymiany lub odbudowy układu krwiotwórczego [1].

Do transplantacji mogą być użyte własne komórki krwiotwórcze (*ang. autologous hematopoietic stem cells transplantation, auto-HSCT*) lub komórki krwiotwórcze (*ang. hematopoietic stem cells, HSC*) pochodzące od dawcy rodzinnego lub niespokrewnionego (*ang. allogeneic HSCT, allo-HSCT*) zgodnego (*ang. matched donor, MD*) lub częściowo niezgodnego (*ang. mismatched donor, MMD*) w zakresie antygenów głównego układu zgodności tkankowej człowieka (*ang. human leukocyte antigens, HLA*), bądź od jednego z rodziców (*ang. haploidentical HSCT, haplo-HSCT*). Ponadto, niezwykle rzadko, dawcą HSC może być bliźniak monozygotyczny (*ang. syngeneic HSCT*).

1.1.2. Zastosowanie allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych w Europie i w Polsce

Opublikowany w 2011 roku raport European Bone Marrow Transplantation Pediatric Diseases Working Party wskazuje, iż w 2008 roku przeprowadzono 26 810 HSCT w 615 ośrodkach transplantacyjnych z 45 krajów świata. Wykonano 10 782 (40%) allo-HSCT i 16 028 (60%) auto-HSCT, co stanowi odpowiednio 7% i 3,5% wzrost w stosunku do roku 2007. Allo-HSCT wykonano z następujących wskazań: 32,6% - ostra białaczka szpikowa (*ang. acute myeloid leukemia, AML*), 17,3% - ostra białaczka limfoblastyczna (*ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL*), 10,6% - zespół mielodysplastyczny (*ang. myelodysplastic syndrome, MDS*), 8,2% - nieziarnicze chłoniaki złośliwe (*ang. non – Hodgkin's Lymphoma, NHL*), 3,6% - przewlekła białaczka szpikowa (*ang. chronic myeloid leukemia, CML*), 2,6% - choroba Hodgkina (*Hodgkin disease, HD*), 0,6% - guzy lite. Choroby nierozrostowe stanowiły 12,2% wszystkich allo-HSCT [2].

Obecnie w Polsce istnieje 5 pediatrycznych ośrodków, w których wykonuje się systematycznie transplantacje komórek krwiotwórczych. Według danych Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Transplantacji Komórek Krwiotwórczych (PPGdsTKK) w latach 1989-2009 w Polsce wykonano u biorców poniżej 18 roku życia 934 allo-HSCT, z czego u 36,7% pacjentów z powodu ALL, 17,7% AML, 11,6% z chorobami wrodzonymi, 10,1% SAA, 9,6% CML, 8,7% MDS, 3,4% NHL, 1,6% z guzami litymi.

1.1.3. Składowe procedury transplantacji komórek krwiotwórczych

Procedura HSCT składa się z poprzedzającej transplantację tzw. kondycjonowania (ang. *conditioning regimen*) biorcy oraz pobrania i dożylnego przetoczenia HSC. Kondycjonowanie biorcy do HSCT w zależności wskazania do zabiegu spełnia odmienną rolę i powinno charakteryzować się:

1. efektem mieloablacyjnym, którego celem jest całkowite zniszczenie własnego szpiku biorcy i przygotowanie przestrzeni do zasiedlenia przez przeszczepiane allogeniczne HSC,
2. efektem immunosupresyjnym, aby zapobiec odrzuceniu przeszczepu,
3. efektem przeciwnowotworowym, dzięki któremu u biorców z chorobami rozrostowymi powinna zostać zniszczona jak największa liczba komórek nowotworowych.

Kondycjonowanie w Polsce prowadzone jest zgodnie z aktualnie obowiązującymi rekomendacjami European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT) oraz Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Transplantacji Komórek Krwiotwórczych (PPGdsTKK). U pacjentów z rozpoznaniem ALL powyżej 2 roku życia allo-HSCT poprzedzona jest frakcjonowanym napromienianiem całego ciała (ang. *fractionated total body irradiation, FTBI*) do dawki 12 Gy z ograniczeniem na pola płucne do dawki 9 Gy. W uzupełnieniu do FTBI stosuje się etopozyd (ang. *etoposide, VP-16*) w jednorazowej dawce 60 mg/kg i.v. U dzieci z ALL w wieku poniżej 2 lat przygotowanie do przeszczepienia jest przeprowadzane za pomocą busulfanu (ang. *busulphan, Bu*) w dawce 1mg/kg/dawkę p.o. 4 razy dziennie przez 4 kolejne dni lub Bu i.v. w dawce od 0,8 do 1,2 mg/kg 4 razy dziennie przez 4 kolejne dni, VP-16 w jednorazowej dawce 40 mg/kg i.v. i cyklofosfamidu (ang. *cyclophosphamid, Cy*) w

dawce 60 mg/kg/dobę i.v. przez kolejne 2 dni. U pacjentów z rozpoznaniem AML, CML i MDS do kondycjonowania stosuje się Bu w dawce 1mg/kg/dawkę p.o. 4 razy dziennie przez 4 kolejne dni lub Bu i.v. w dawce od 0,8 do 1,2 mg/kg 4 razy dziennie przez 4 kolejne dni oraz Cy w dawce 60 mg/kg/dobę i.v. przez kolejne 2 dni. Dzieci z rozpoznaniem MDS dodatkowo otrzymują melfalan (*ang. melphalan, Mel*) w dawce 140 mg/m² i.v. jednorazowo. U wszystkich biorców z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego poddanych allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego lub częściowo niezgodnego dawcy rodzinnego w ramach kondycjonowania stosowana jest globulina antytymocytarna (*ang. anti-thymocyte globulin, ATG*) i.v. w dawce sumarycznej 6-10 mg/kg i.v. w celu deplecji limfocytów T *in vivo*.

U dzieci z SAA w przypadku transplantacji od pełni zgodnego dawcy rodzinnego w kondycjonowaniu stosuje się Cy w dawce 50 mg/kg/dobę i.v. przez 4 kolejne dni oraz ATG w dawce sumarycznej 10 mg/kg, natomiast w przypadku transplantacji od dawców rodzinnych częściowo zgodnych oraz dawców niespokrewnionych należy użyć fludarabiny (*ang. fludarabine, Flu*) w dawce 150 mg/m², Cy w dawce 25 mg/kg/dobę i.v. przez 4 dni i ATG w dawce sumarycznej 10 mg/kg. U pacjentów z niedokrwistością Fanconiego (*ang. Fanconi anemia, FA*) podaje się niskie dawki Bu w dawce 0,8 mg/kg i.v. 2 razy dziennie przez 2 kolejne dni, Cy w dawce 10 mg/kg/dobę i.v. przez 4 dni oraz Flu w dawce 35 mg/m² i.v. przez 4 dni oraz ATG w dawce sumarycznej 10 mg/kg i.v.

W profilaktyce choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (*ang. graft-versus-host-disease, GvHD*) stosuje się cyklosporynę A (*ang. cyclosporin A, CsA*) od dnia poprzedzającego przeszczepienie komórek krwiotwórczych, do 60 doby po allo-HSCT (u pacjentów z ALL i AML, u których materiał przeszczepowy pochodził od dawcy rodzinnego oraz u dzieci z chorobami metabolicznymi), do 80 doby po allo-HSCT (u

pacjentów z ALL i AML, u których materiał przeszczepowy pochodził od dawcy niespokrewnionego), do 100 doby po allo-HSCT (u dzieci z CML, MDS, SAA i FA). Dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego poddane allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego oraz dzieci z SAA otrzymują dodatkowo Metotreksat (*ang. methotrexate, MTX*) w dawce 10 mg/m² i.v. w 1, 3, i 6 dobie po allo-HSCT oraz Leucovorin-Calcium 15 mg/m² w dobie 2, 4 i 7. U dzieci z FA w profilaktyce GvHD poza CsA ma zastosowanie także mykofenolan mofetilu (*ang. mycophenolan mofetil, MMF*).

U dzieci z chorobami metabolicznymi i niedoborami odporności, uznanymi za wskazanie do allo-HSCT, kondycjonowanie i profilaktyka GvHD prowadzone powinny być zgodnie z aktualizowanymi każdego roku wytycznymi EBMT Inborn Errors Working Party.

Transplantację, czyli dożylnie przetoczenie komórek krwiotwórczych, przeprowadza się najczęściej 48 godzin po zakończeniu kondycjonowania, tzn. po eliminacji z krwi biorcy cytostatyków i/lub ich aktywnych metabolitów zastosowanych w kondycjonowaniu.

Źródłem przeszczepianych HSC może być szpik kostny (*ang. bone marrow, BM*). Od 1994 roku źródłem komórek używanych do transplantacji jest także krew obwodowa (*ang. peripheral blood, PB*). W ostatnich latach coraz częściej źródłem komórek jest krew pępowinowa (*ang. cord blood, CB*) [1]. Obecnie transplantacja komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego (*ang. matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation, MUD-HSCT*) stanowi około 60-65%, a od dawcy rodzinnego (*ang. matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation, MSD-HSCT*) 35-40% wszystkich allo-HSCT [2].

1.2. Wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych oraz przyczyny jej niepowodzeń u dzieci i młodzieży

1.2.1. Wskazania do HSCT u dzieci i młodzieży

Allo-HSCT od dawców spokrewnionych, a także niespokrewnionych jest obecnie w pełni uznaną metodą terapii wielu chorób nowotworowych i nienowotworowych. W wielu spośród około 250 chorób rozrostowych i nierozrostowych allo-HSCT stała się metodą leczenia z wyboru. Wskazania do allo-HSCT są uzasadnione wówczas, gdy wyniki leczenia konwencjonalnego są niesatysfakcjonujące, a allo-HSCT zamiennie zwiększa szanse chorego na wyleczenie. EBMT wyróżnia obecnie 3 kategorie transplantacji komórek krwiotwórczych:

1. standardowe (*ang. standard; S*),
2. wykonywane w ramach kontrolowanych protokołów klinicznych (*ang. clinical option; CO*),
3. eksperymentalne (*ang. developmental, D*) [1,3].

Aktualne wskazania do HSCT u dzieci i młodzieży rekomendowane przez *EBMT Pediatric Diseases Working Party* przedstawiono w tabeli 1.2.1. [3]. W oparciu o obecnie obowiązujące protokoły terapeutyczne w ośrodkach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. leczenia Białaczek i Chłoniaków, Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Guzów Litych oraz zgodnie z zaleceniami EBMT, wskazania do allo-HSCT podlegają modyfikacji przez PPGdsTKK.

Tabela 1.2.1. Wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych u dzieci i młodzieży rekomendowane przez EBMT Pediatric Diseases Working Party (Ljungman i in. Bone Marrow Transplant 2006; 37 (5): 439-449)

Rozpoznanie	Stopień Zaawansowania	Transplantacja allogeniczna			Transplantacja autologiczna
		MSD	MUD	MMUD	
AML	CR1 niskiego ryzyka	GNR	GNR	GNR	GNR
	CR1 wysokiego ryzyka	S	CO	GNR	S
	CR1 bardzo wysokiego ryzyka	S	S	CO	GNR
	CR2	S	S	S	S
	>CR2	CO	D	D	GNR
ALL	CR1 niskiego ryzyka	GNR	GNR	GNR	GNR
	CR1 wysokiego ryzyka	S	CO	CO	GNR
	CR2	S	S	CO	CO
	>CR2	S	S	CO	CO
CML	faza przewlekła	S	S	D	D
	faza zaawansowana	S	S	D	GNR
NHL	CR1 niskiego ryzyka	GNR	GNR	GNR	GNR
	CR1 wysokiego ryzyka	CO	CO	GNR	CO
	CR2	S	S	CO	CO
HD	CR1	GNR	GNR	GNR	GNR
	I wznowa, CR2	CO	D	GNR	S
MDS		S	S	D	GNR
PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI		S	S	S	NA
TALASEMIE		S	CO	GNR	NA
NIEDOKRWISTOŚĆ SIERPOWATO – KRWINKOWA		S	CO	GNR	NA
FA		S	S	CO	NA
B-DA		S	CO	GNR	NA
MPS I (Z.HURLER)		S	S	CO	NA
MPS I (HURLER-SCHEIE)		GNR	GNR	GNR	NA
MPS VI (MAROTEAUX-LAMY)		CO	CO	CO	NA

CO – leczenie w ramach kontrolowanego protokołu klinicznego,

D – leczenie eksperymentalne,

GNR – brak rekomendacji,

NA – nie ma zastosowania,

S - leczenie standardowe.

Tabela 1.2.1. cd Wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych u dzieci i młodzieży rekomendowane przez EBMT Pediatric Diseases Working Party (Ljungman i in. Bone Marrow Transplant 2006; 37 (5): 439-449)

OSTEOPETROZA		S	S	S	NA
INNE CHOROBY SPICHRZENIOWE		GNR	GNR	GNR	GNR
CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE		GNR	GNR	GNR	CO
GUZY ZARODKOWE		GNR	GNR	GNR	CO
MIĘSAK EWINGA	wysokiego ryzyka, >CR1	D	GNR	GNR	S
MIĘSAKI TKANEK MIĘKKICH	wysokiego ryzyka, >CR1	D	D	GNR	CO
NEUROBLASTOMA	wysokiego ryzyka	CO	GNR	GNR	S
NEUROBLASTOMA	>CR1	CO	D	D	S
GUZ WILMSA	>CR1	GNR	GNR	GNR	CO
MIĘSAK KOŚCIOPOCHODNY		GNR	GNR	GNR	D
GUZY MÓZGU		GNR	GNR	GNR	CO

CO – leczenie w ramach kontrolowanego protokołu klinicznego,

D – leczenie eksperymentalne,

GNR – brak rekomendacji,

NA – nie ma zastosowania,

S - leczenie standardowe.

1.3. Kondycjonowanie przed transplantacją komórek krwiotwórczych

1.3.1. Napromienienie całego ciała

Napromienianie całego ciała (*ang. total body irradiation, TBI*) jako część procedury transplantacyjnej stosowane jest odkąd w 1951 r Lorenz i wsp. wykazali, że dożylnie podanie komórek szpiku zapewnia odnowę krwiotworzenia po uprzednim jego zniszczeniu przez napromienienie [3]. W TBI jako źródło promieniowania stosuje się aktualnie akcelerator liniowy. TBI ma najskuteczniejsze działanie przeciwnowotworowe spośród wszystkich innych czynników stosowanych w kondycjonowaniu, odgrywając szczególną rolę w niszczeniu komórek nowotworowych znajdujących się w fazie G₀, komórek opornych na chemioterapię oraz komórek zasiedlających tzw. sanktuaria onkologiczne (mózg, gonady). Poza tym TBI ma również bardzo dobry efekt immunosupresyjny. TBI stosowane w skojarzeniu z wysokimi dawkami cytostatyków, poprawia skuteczność działania przeciwnowotworowego [4, 5]. Początkowo pacjenci leczeni TBI otrzymywali całą należną dawkę promieniowania w ciągu jednego dnia. Ze względu na często obserwowane objawy wczesnej toksyczności narządowej (głównie ze strony płuc pod postacią tzw. idiopatycznego śródmiąższowego zapalenia płuc, *ang. idiopathic interstitial pneumonia, IIP*), TBI zostało zastąpione przez frakcjonowane napromienianie całego ciała (*ang. fractionated total body irradiation, FTBI*), w którym podawane są dwie dawki dziennie w odstępach conajmniej 6 godzinnych przez conajmniej 3 dni do dawki sumarycznej 12 Gy [6], z ograniczeniem na pola płucne do 9 Gy [7, 8]. Zmniejszyło to ryzyko IIP z 70% do 4-37% [8-10]. Zaobserwowano, iż prawdopodobieństwo wznowy choroby nowotworowej maleje wraz ze wzrostem dawki promieniowania (TBI było prowadzone w zakresie

dawek od 10 Gy do 16 Gy), ale jednocześnie narastają objawy toksyczności narządowych. Podatność tkanki na uszkodzające działanie napromienienia jest tym większa, im większa jest aktywność proliferacyjna tworzących ją komórek. We wczesnym okresie po FTBI obserwuje się uszkodzenie szpiku kostnego w postaci ostrego surowiczego zapalenia szpiku, zanik elementów morfotycznych szpiku za wyjątkiem komórek plazmatycznych i makrofagów [11]. W obrębie przewodu pokarmowego szczególnie narażone są śluzówki (najbardziej jelita cienkiego), co klinicznie manifestuje się nudnościami, wymiotami, utratą łaknienia, zmianami zapalnymi jamy ustnej, dolegliwościami bólowymi w zakresie jamy ustnej i brzucha, wodnistą biegunką [12-18]. Inne wczesne powikłania po FTBI obejmują uogólniony rumień skóry oraz wypadanie włosów [16], VOD [19, 20], zapalenie ślinianek przyusznych [8] oraz „zespół senności” (ból głowy, nudności ospałość) [21, 22]. Natomiast do najczęstszych późnych powikłań po FTBI należą: zahamowanie wzrostu, bezpłodność, niedoczynność tarczycy, zwłóknienie płuc, zaćma oraz wtórne nowotwory (głównie osteochondroma) [23-26].

1.3.2. Chemioterapia mieloablacyjna

Busulfan (Bu) należy do grupy leków alkilujących. Do komórki dostaje się na drodze dyfuzji biernej. Na drodze hydrolizy, w środowisku wodnym, odszczepiane są od busulfanu grupy metylosulfonianowe. Powstłe jony karbonowe alkilują nić DNA poprzez złamanie pojedynczych nici kwasu DNA. Odbywa się to poprzez tworzenie czterowęglowych, dwuguaninowych wiązań krzyżowych z resztami guaninowymi DNA. Busulfan jest metabolizowany w wątrobie po połączeniu z glutationem w reakcji katalizowanej przez S-transferazę glutationową. Wydalanie leku w 98% odbywa się z

moczem (przede wszystkim w postaci metabolitów). Dawka mieloablacyjna busulfanu wynosi 16 mg/kg [27-29]. Wczesne objawy toksyczności po zastosowaniu busulfanu obejmują: uszkodzenie skóry (rumień, obrzęk, pęcherze, złuszczenie naskórka), uszkodzenie wątroby (VOD, zwłaszcza w dawkach przekraczających 16 mg/kg m.c.), powikłania neurologiczne (uogólnione drgawki).

Treosulfan (Trs) jest pro-lekiem, strukturalnym analogiem busulfanu. Jest on aktywowany na drodze nieenzymatycznej do postaci pośredniej 1,2-epoxy-3,4-butanediol-4-metanosulfonu w temperaturze 37⁰C i pH 7,4. PO Odszczepienie 2 moli kwasu metanosulfonowego od 1,2-epoxy-3,4-butanediol-4metanosulfonu powstaje L(+)-diepoksybutanu, który jest aktywnym metabolitem doprowadzającym do uszkodzenia nici DNA [30]. 25% do 90% treosulfanu ulega wydaleniu przez nerki w postaci niezmienionej [31]. Po zastosowaniu treosulfanu można obserwować toksyczność narządową, przede wszystkim ze strony przewodu pokarmowego (zapalenie błon śluzowych jamy ustnej, biegunka) i skóry (nasilony świąd skóry, rumień, złuszczenie naskórka, hiperpigmentacja) oraz kwasicę metaboliczną.

Melfalan (Mel) jest dwufunkcyjnym związkem alkilującym. Karboniowe związki pośrednie, utworzone przez grupy bis-2-chloroetylowe, alkilują poprzez kowalencyjne ich związanie z atomami azotu, w cząsteczce guaniny w nici DNA co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych. Od 5% do 15% podanej dawki melfalanu jest wydzielane przez nerki. Maksymalna tolerowana dawka wynosi 200 mg/m², jeśli melfalan jest jedynym stosowanym cytostatykiem i 140 mg/m², jeżeli podawany jest w skojarzeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Wczesne powikłania, które mogą wystąpić podczas podawania melfalanu obejmują: nudności, wymioty, reakcje nadwrażliwości ze strony skóry i układu oddechowego oraz przewodu pokarmowego (zapalenie błon śluzowych jamy ustnej) i wątroby (VOD). W połączeniu

z busulfanem zwiększa ryzyko rozwoju VOD. Odległym następstwem po zastosowaniu melfalanu jest uszkodzenie mięśnia sercowego oraz zwłóknienie płuc [32- 34].

Cyklofosfamid (Cy) jest pro-lekiem należącym do grupy leków alkilujących z grupy oksazafosforyn. Cyklofosfamid ulega aktywacji pod wpływem cytochromu P450 do 4-hydroksycyklofosfamidu. Działanie przeciwnowotworowe Cy wywierają cytotoksyczne metabolity, które indukują proces apoptozy poprzez tworzenie wiązań krzyżowych z nićmi DNA. Działanie to nie jest specyficzne dla fazy cyklu komórkowego. Lek poza właściwościami przeciwnowotworowymi, wykazuje także działanie immunosupresyjne. Maksymalna, tolerowana dawka leku wynosi około 200 mg/kg. Metabolity, w tym m.in. akroleina, oraz część niezmetabolizowana cyklofosfamidu wydzielane są z moczem przez nerki i mogą uszkadzać: drogi moczowo-płciowe, powodując krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, obrzęk ściany pęcherza, krwawienie podśluzówkowe, zapalenie śródmiąższowe ze zwłóknieniem ściany pęcherza, niewydolność nerek, nieodwracalne zaburzenia spermatogenezy, a także serce wywołując nadkomorowe zaburzenia rytmu, nieswoiste zmiany odcinka ST i załamka T, zapalenie osierdzia, niewydolność krążenia oraz wątrobę prowadząc do VOD oraz zespołu Budd-Chiariego [35-37].

Etopozyd (VP-16) jest półsyntetyczną pochodną epipodofilotoksyny. Hamuje topoizomerazę II, która bierze udział w syntezie DNA. Lek działa głównie w fazie G2 cyklu komórkowego i powoduje zahamowanie metafazy. Konsekwencją jest zahamowanie podziału komórki w fazie profazy (małe dawki) lub liza komórek wchodzących w fazę mitozy (wysokie dawki). Maksymalna dawka VP-16 wynosi około 2400 mg/m². Metabolizowanie etopozydu odbywa się w wątrobie i polega na jego glukuronizacji. Około 40-70% leku jest wydzielane przez nerki z moczem, z czego około 60% w postaci niezmienionej. Wczesne objawy toksyczności obejmują:

niedociśnienie tętnicze, nadciśnienie tętnicze, tachykardię, skurcz oskrzeli, nudności, wymioty i zaczerwienienie skóry. Inne objawy niepożądane to: wysypka, złuszczenie skóry okolicy dłoni i stóp, zmiany naciekowe w obrębie paznokci oraz podrażnienie skóry okolicy odbytu, czuciowe neuropatie obwodowe [38, 39].

Tiotepa (TT) należy do środków alkilujących. Jest pochodną N,N',N'-trietylenofosforamidu, wieloczynnym środkiem cytotoksycznym związanym pod względem chemicznym i farmakologicznym z iperytem azotowym. Działanie tiotepy odbywa się poprzez uwolnienie rodników imin etylenowych, w wyniku czego, dochodzi do rozerwania wiązań DNA. Tiotepa ulega metabolizmowi w wątrobie, a jej metabolity wykryto w moczu w ciągu 1 godziny po wlewie. Tiotepa ulega desulfuryzacji oksydacyjnej w układzie enzymatycznym cytochromu P450: CYP2B i CYP3A do głównego czynnego metabolitu trietylenofosforamid. Wszystkie wykryte metabolity: trietylenofosforamid, monochlorotepa i tiotepa-kwas merkapturanowy są wydalane z moczem. Wydalanie tiotepy i trietylenofosforamidu z moczem jest niemal całkowicie zakończone odpowiednio po 6 i 8 godzinach. Wczesne powikłania, które mogą wystąpić podczas podawania tiotepy obejmują nudności, wymioty, reakcje nadwrażliwości ze strony skóry i układu oddechowego [36].

1.4. Kaskada krzepnięcia

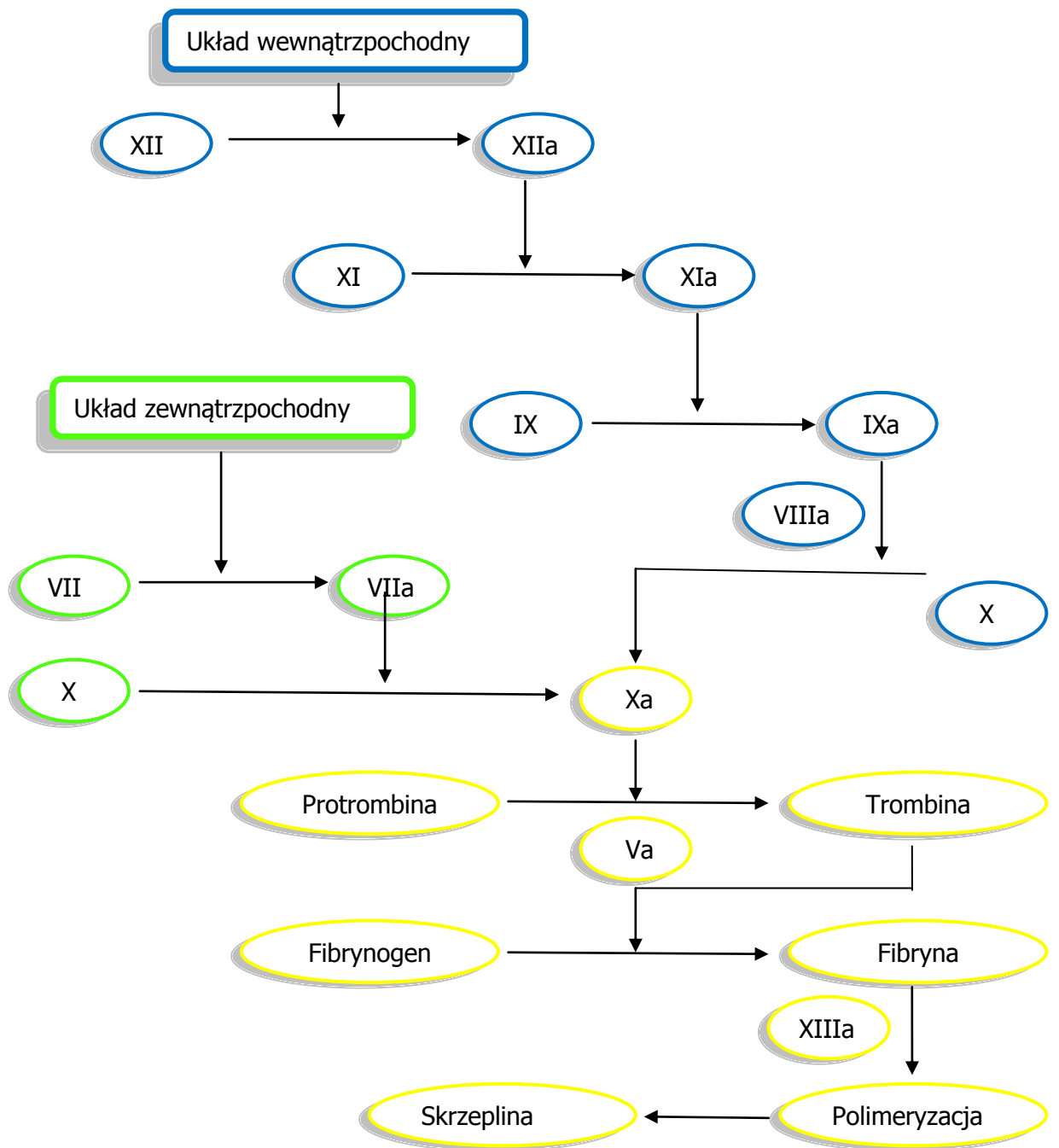
1.4.1. Zewnątrz- i wewnątrzpochodna droga krzepnięcia

Istnieją dwie drogi aktywacji krzepnięcia krwi. Teoria ta została po raz pierwszy sformułowana przez Waalera w 1957 r. [40]. W myśl aktualnych poglądów drogę zewnątrzpochodną indukuje odsłonięcie czynnika tkankowego (*ang. tissue factor, TF*),

który jest kofaktorem czynnika VIIa. Czynniki te znajdują się, m.in. w komórkach śródbłonka naczyń mikrokrążenia śledziony, w komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych, komórkach nabłonka kłębuszków nerkowych [41]. TF odsłonięty na skutek uszkodzenia komórek śródbłonka np. przez uraz, zabieg operacyjny aktywuje kaskadę krzepnięcia. Uwolnione pod wpływem różnych czynników endotoksyny: czynniki martwicy nowotworów (*ang. tumor necrosis factor, TNF*), interleukina-1 (IL-1), czy też dopełniacz, szczególnie jego składnik C5a mogą aktywować drogę zewnątrzpochodną układu krzepnięcia [42-45]. Na podobnej drodze jak endotoksyna są w stanie aktywować układ krzepnięcia, mukopolisacharydy błony komórkowej bakterii. Ponadto TF może być też obecny na komórkach nowotworowych [46]. Uszkodzenie śródbłonka umożliwia połączenie się czynnika VII z jego kofaktorem – TF – i wytworzenie przy współudziale jonów wapnia i fosfolipidów proteolitycznie aktywowanego kompleksu [47]. Aktywacja kompleksu TF/VIIa może również odbywać się pod wpływem aktywnych czynników krzepnięcia, takich jak: IXa, Xa, VIIa [48]. Kompleks TF/VIIa aktywuje czynnik IX, który wraz z aktywnym czynnikiem VIIIa, jonami wapnia i fosfolipidami tworzy kompleks zwany tenazą. Zadaniem tenazy jest aktywacja czynnika X, który w obecności czynnika Va i fosfolipidów powierzchniowych tworzy kolejny kompleks, zwany protrombinazą. Protrombinaza przekształca protrombinę do trombiny. Trombina rozszczepia cząsteczki fibrynogenu na monomery fibryny i fibrynopeptydy A i B. Monomery fibryny polimeryzują, tworząc złoże fibryny.

Drogę wewnątrzpochodną rozpoczyna aktywacja czynnika XII wskutek kontaktu czynnika z uszkodzonymi tkankami bogatymi w kolagen bądź w usiarczone białka. Czynniki XIIa przekształca prekalikreinę w kalikreinę, która również zwrotnie może aktywować czynnik XII. Czynniki XIIa aktywuje czynnik XI, a ten czynnik IX.

Aktywny czynnik IX aktywuje podobnie jak entaza czynnik X, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia włóknika.



Ryc. 1.4.1. Kaskada krzepnięcia (rysunek własny w oparciu o: Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. Blood Coagul Fibrinolysis. 1995; 6: 7-13)

1.4.2. Układ białka C

Układ białka C tworzą: białko C (*ang. protein C, PC*), trombomodulina (*ang. thrombomodulin, TM*), śródbłonkowy receptor dla białka C (*ang. endothelial cell protein C receptor, EPCR*) i białko S (*ang. protein S, PS*).

1.4.2.a. Białko C (*ang. protein C, PC*)

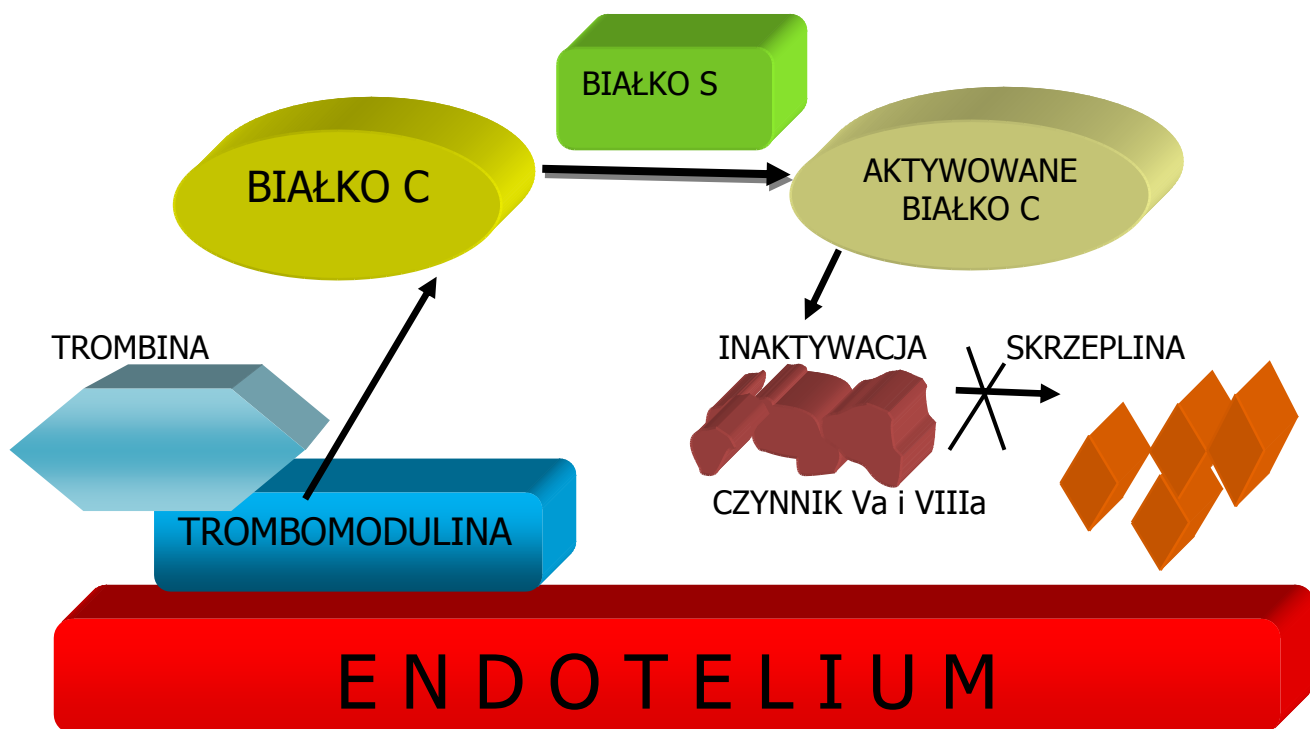
PC należy do witaminy K–zależnych białek o masie cząsteczkowej 62000 D, produkowanych przez wątrobę, komórki śródbłonka i keratynocyty. Stężenie PC w surowicy zdrowego noworodka oraz u niemowląt do 4-6 miesiąca życia wynosi 35 (17-53) U/dL, a następnie wzrasta do poziomu spostrzeganego u zdrowych osób dorosłych, tj. 96 (64-128) U/dL [49]. Czas półtrwania tego białka wynosi od 7 do 10 godzin [50]. PC jest produkowane w postaci nieaktywnej i ulega konwersji w postać aktywną – (*ang. activated protein C, APC*) pod wpływem trombomoduliny. APC wraz ze swoim kofaktorem - białkiem S są inhibitorami czynnika Va i VIIa i pośrednio wpływają na zmniejszenie produkcji trombiny. Trombina stymuluje przekształcanie się fibrynogenu we włóknik po odszczepieniu fibrynopeptydów A i B. APC ułatwia również uwalnianie tkankowego aktywatora plazminogenu (*ang. tissue plasminogen activator, t-PA*) oraz inaktywuje inhibitory tkankowego aktywatora plazminogenu (*inhibitor of tissue plasminogen activator, PAI-1 i PAI-3*) [51]. W badaniach na zwierzętach zaobserwowano, że APC hamuje uwalnianie TNF α i inne cytokiny oraz hamuje migrację leukocytów w tkance płucnej. [52]. W warunkach fizjologicznych inhibitorem PC jest białko PCI (*ang. inhibitor of protein C*) oraz α 1–antytrypsyna (α 1-AT) [51].

1.4.2.b. Białko S (*ang. protein S, PS*)

PS jest glikoproteiną zależną od witaminy K i występuje we krwi w 2 formach: wolnej (30%) i związanej z białkiem układu dopełniacza C4bBP (70%). Tylko postać wolna PS pełni rolę kofaktora reakcji przekształcenia nieaktywnej postaci PC w APC. PS posiada cztery istotne dla prawidłowego funkcjonowania układu krzepnięcia regiony: region kwasu γ -karboksylglutaminowego (Gla), region TSR (*ang. thrombin sensitive region*), region EGF (*ang. epidermal growth factor*) i region SHBG (*ang. sex hormon binding globulin*). Białko S wiąże APC w regionie Gla, TSR i EGF, a białko C4bBP w regionie SHBG [53-55].

1.4.2.c. Trombomodulina (*ang. thrombomodulin, TM*)

TM jest glikoproteiną przezbłonową, głównie komórek śródbłonka tętnic, żył i naczyń włosowatych. Wytwarzana jest przez śródbłonek mikrokrążenia płuc, płytki krwi, monocyty i neutrofile. TM ma masę cząsteczkową 75 000 D i składa się z 557 aminokwasów podzielonych na 5 domen, z czego trzy to domeny zewnątrzkomórkowe, czwarta to część przezbłonowa, natomiast piątą stanowi krótką część wewnątrzkomórkową zwaną „ogonem” cytoplazmatycznym. Pod wpływem wielu czynników dochodzi do odłączania zewnątrzbłonowego fragmentu TM. Jest ona określana jako frakcja rozpuszczalna TM (*ang. soluble thrombomodulin, sTM*). TM zmienia właściwości trombiny z pro- na przeciwzakrzepową. Trombina po połączeniu z trombomoduliną traci powinowactwo do fibrynogenu, staje się natomiast aktywatorem białka C [50, 51].

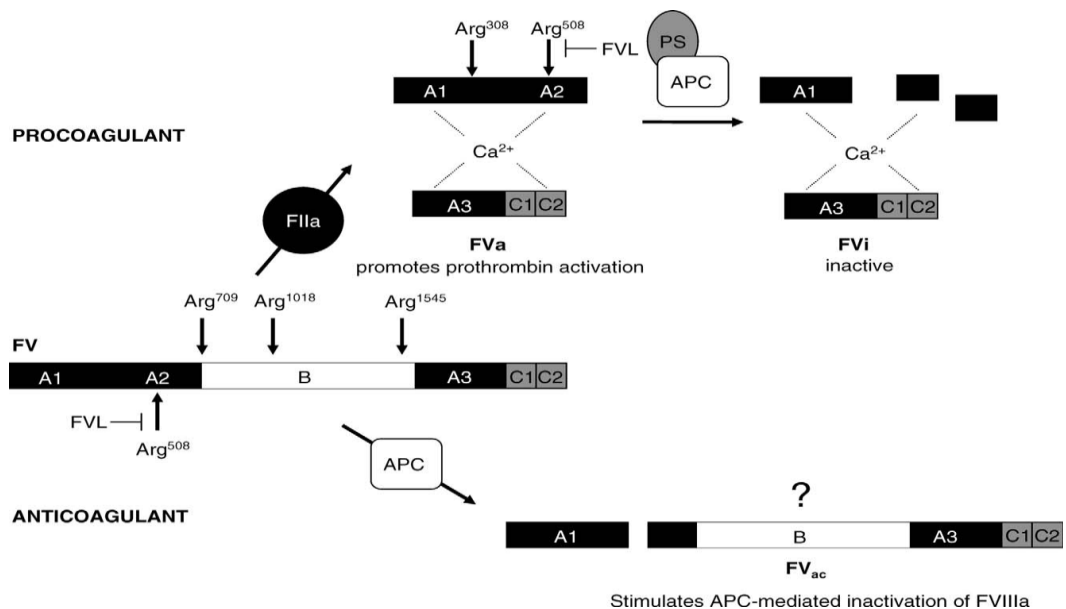


Ryc. 1.4.2. Układ białka C (rysunek własny w oparciu o: Esmon CT. The Protein C Pathway. Chest. 2003; 124: 26-32.)

1.4.3. Oporność na aktywowane białko C (*ang. activated protein C resistance, APCr*), mutacja genu czynnika V

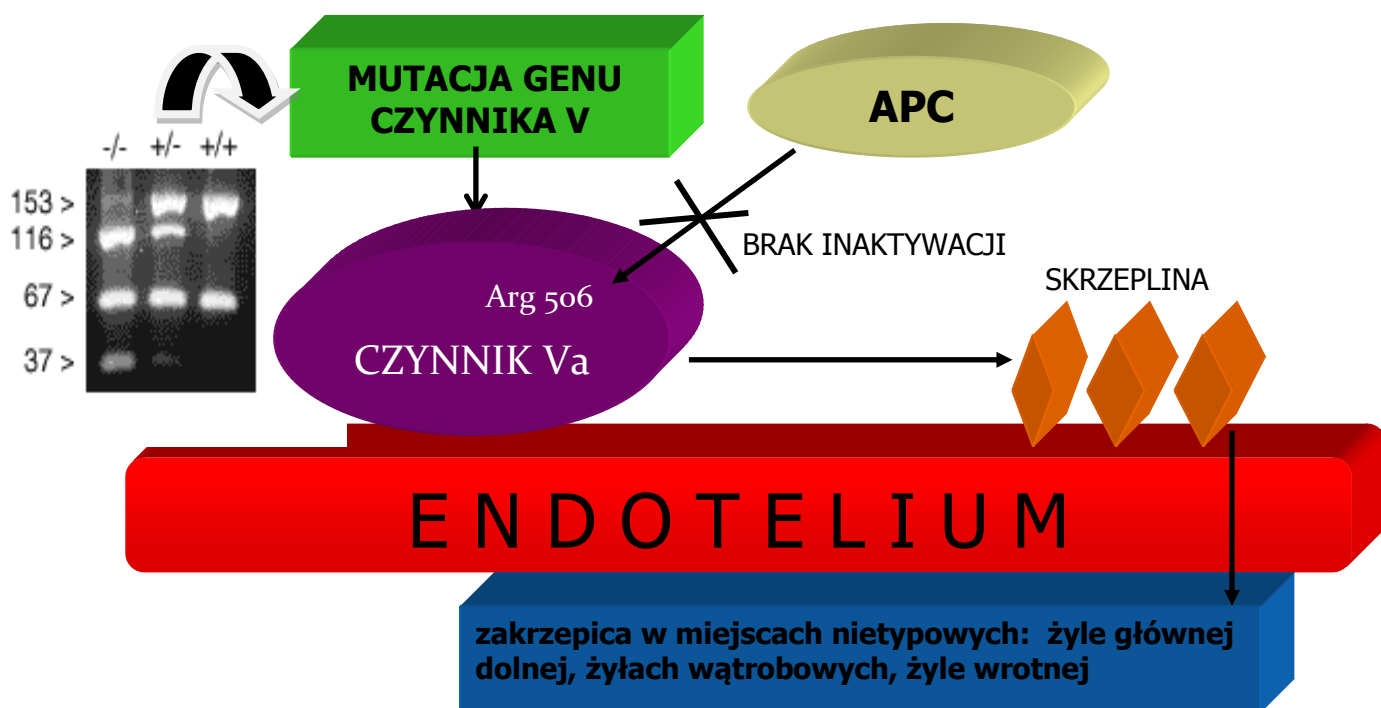
Oporność na aktywowane białko C (*ang. activated protein C resistance, APCr*), czyli oporność czynnika V na antykoagulacyjne działanie APC jest najczęstszą wrodzoną trombofilią i dotyczy w Polsce 12% chorych z zakrzepicą przed 45 rokiem życia [56]. Czynniki V syntetyzowany jest w wątrobie, powstaje także w monocytach, makrofagach i megakariocytach. Czas jego biologicznego półtrwania wynosi 12 godzin. Czynniki V przekształcany jest przez trombinę w formę aktywną (czynnik Va). Czynniki V podlega trombino-zależnej aktywacji i APC-zależnej inaktywacji. Połączenie trombiny z czynnikiem V w obszarze domeny B w regionach Arg709, Arg1018 oraz Arg 1545 skutkuje powstaniem postaci aktywnej - czynnika Va. Czynniki Va jest

heterodimerem, składającym się z dwóch ramion: ciężkiego o masie 105 000 D oraz lekkiego o masie 71 000 D, połączonych ze sobą wiązaniem niekowalencyjnym. Czynniki Va wraz z czynnikiem Xa oraz jonami wapnia tworzy kompleks protrombinazy, którego zadaniem jest przekształcanie protrombiny w trombinę. Czynniki Va poza aktywnością prokoagulacyjną, pełni również funkcję antykoagulacyjną (APC-zależną). Proteoliza czynnika Va do czynnika V_i pod wpływem APC, odbywa się po połączeniu APC z czynnikiem Va w pozycjach Arg306, Arg506 oraz Arg679 łańcucha ciężkiego czynnika Va. Inaktywacja czynnika Va po związaniu z nim APC w pozycji Arg679 nie odgrywa istotnej roli w fizjologii. Rolą czynnika Va jest również inaktywacja czynnika VIIIa do czynnika VIIIi, co jest inicjowane połączeniem APC z czynnikiem Va w pozycji Arg 506 i powstaniem czynnika V_{ac}, który inaktywuje czynnik VIIIa – Ryc. 1.4.3.a. [57].



Ryc. 1.4.3.a. Prokoagulacyjna oraz antykoagulacyjna rola czynnika V (Rosendorff A, Dorfman DM. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131: 866–871)

APCr u ponad 90% pacjentów spowodowana jest punktową mutacją genu czynnika V na chromosomie I (mutacja Leiden). Dziedziczenie mutacji Leiden jest autosomalne dominujące. Mutacja genu czynnika V (Leiden) dotyczy od 2% do 10% rasy kaukaskiej. Najczęściej spotykana na Cyprze, w południowej Szwecji, Niemczech oraz Arabii Saudyjskiej oraz wśród społeczności żydowskiej w Izraelu. Niespotykana natomiast w Afryce oraz w populacji chińskiej i japońskiej. W 90% przypadków mutacji Leiden, defekt polega na zastąpieniu argininy w pozycji 506 łańcucha ciężkiego czynnika V glutaminą, efektem czego jest oporność na proteolizę pod wpływem APC oraz zachowanie przez czynnik V aktywności prokoagulacyjnej. Dodatkowo wyłączony zostaje mechanizm inaktywacji czynnika VIIIa przez czynnik Vac. Najczęstszymi objawami mutacji Leiden są zakrzepowe zapalenie żył głębokich i powierzchownych kończyn dolnych oraz zakrzepica w miejscach nietypowych: żyły głównej dolnej, żyły wrotnej, żyłach wątrobowych. Około 10% przypadków ze stwierdzoną APCr, nie jest nosicielami mutacji genu czynnika V Leiden, tylko innego defektu: mutacja genu protrombiny, czynnika V Cambridge, Liverpool i innego [57].



Ryc. 1.4.3.b. Mutacja genu czynnika V (Leiden) (rysunek własny w oparciu o: Rosendorff A, Dorfman DM. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131: 866–871)

1.5. Wybrane wczesne powikłania transplantacji komórek krwiotwórczych

W okresie okołotransplantacyjnym (od początku kondycjonowania do 100 doby po transplantacji) w następstwie kondycjonowania dochodzi do wielu nieuniknionych zaburzeń homeostazy, w tym homeostazy immunologicznej, takich jak mieloablacja, immunosupresja z upośledzoną odpowiedzią komórkową i humoralną, tzw. burza cytokinowa (uwalnianie IL-6, IL-8, TNF- α , leukotrienów i tromboksanów) oraz uszkodzenie śródbłonnków, z następową aktywacją kaskady krzepnięcia i układu dopełniacza. Na skutek powyższych zaburzeń mogą rozwijać się niżej wymienione, zagrażające życiu powikłania [19, 52, 58-61]: zespół niedrożności żył wątrobowych (*ang. veno-occlusive disease, VOD*), mikroangiopatia zakrzepowa (*ang. thrombotic*

microangiopathy, TAM), zespół przesiąkania włosniczek (*ang. capillary leak syndrome, CLS*), a w konsekwencji również zespół niewydolności wielonarządowej (*ang. multiorgan dysfunction syndrome, MODS*).

1.5.1. Zespół okluzji naczyń żylnych (*ang. veno-occlusive disease, VOD*)

VOD występuje wśród 5% do 39% pacjentów pediatrycznych po allo-HSCT. Obserwowany najczęściej w pierwszych 4 tygodniach po allo-HSCT [62]. Śmiertelność w VOD wynosi od 10% do 90% [19].

VOD charakteryzuje się niedrożnością drobnych naczyń wewnątrzwątrobowych, co jest następstwem uszkodzenia komórek śródbłonna zatok żylnych oraz drobnych żył wątrobowych przez FTBI oraz toksyczne metabolity leków zastosowanych w kondycjonowaniu. Metabolizm chemioterapeutyków zastosowanych w terapii mieloablacyjnej odbywa się przede wszystkim przy udziale cytochromu P-450, który zlokalizowany jest w strefie 3 zrazików wątrobowych. Niedostateczny przepływ przez drobne naczynia wewnątrzwątrobowe sprzyja uszkodzeniu układu enzymatycznego P-450. Uszkodzeniu temu sprzyja również gromadzenie się toksycznych metabolitów chemioterapeutyków w strefie 3 zrazików wątrobowych. Uszkodzone komórki śródbłonna aktywują wykrzepianie w świetle zatok żylnych oraz drobnych żył wątrobowych, poprzez odsłonięcie zlokalizowanego podśródbłonkowo TF oraz uwalnianie TNF α [20]. Dalszemu zwężaniu światła naczyń żylnych wątroby sprzyja uwalnianie z uszkodzonych śródbłonnków endotelin, które zwężają światło wątrobowych naczyń krwionośnych oraz pobudzają agregację płytek krwi [63]. Upośledzony przepływ przez żyły wątrobowe prowadzi w konsekwencji do hepatomegalii, nadciśnienia wrotnego oraz innych powikłań, takich jak: zespół wątrobowo-nerkowy,

krwawienie z górnego odcinka przewodu pokarmowego, zespół niewydolności wielonarządowej [20].

Wśród czynników ryzyka VOD wymienia się: wiek (częściej wśród biorców HSC poniżej 5 roku życia) [19, 62], zaawansowaną chorobę nowotworową u biorcy HSC (druga i kolejne remisje choroby nowotworowej) [19], radioterapię wątroby biorcy HSC w okresie przedtrasplantacyjnym [19, 20], podwyższone poziomy aminotransferaz w okresie przedtransplantacyjnym u biorcy HSC [20], marskość wątroby biorcy HSC w okresie przedtransplantacyjnym [19, 20], zastosowanie w leczeniu gemtuzumabu ozogamicyny w okresie przedtransplantacyjnym [19], HSCT z następujących wskazań: osteopetroza, limfohistiocytoza hemofagocytarna, adrenoleukodystrofia, neuroblastoma [19], allo-HSCT od w pełni zgodnego i częściowo zgodnego dawcy niespokrewnionego [19], transplantację haploidentyczną [19], drugą i każdą kolejną allo-HSCT [19], mieloablacyjną terapię kondycjonującą opartą na Bu [19, 62, 64], Bu + CY [62, 65], TBI [19, 20], allo-HSCT, dla której źródłem komórek jest BM [20], reaktywację cytomegalowirusa (*ang. cytomegalovirus, CMV*) po allo-HSCT [20], stosowanie leków o działaniu hepatotoksycznym po allo-HSCT (ketokonazolu, CsA, MTX, amfoterycyny B, wankomycyny, acykloviru) [20].

W leczeniu przyczynowym VOD stosuje się Defibrotide w dawce 4 x 10 mg/kg m.c w połączeniu z heparyną lub bez niej. Bardzo ważne jest postępowanie objawowe, które obejmuje restrykcje płynowe, stosowanie leków diuretycznych (Furosemid, Dopamina), substytucję albumin, podawanie leków analgetycznych, odbarczenie jamy otrzewnej, jamy opłucnej, hemodializę, chirurgiczne wytworzenie krążenia obocznego i ewentualnie transplantację wątroby [20].

Działania mające na celu zapobieżenie wystąpieniu VOD oraz działania diagnostyczne w VOD szczegółowo opisano w rozdziale 3.5.1.

1.5.2. Mikroangiopatia skojarzona z HSCT (*ang. transplantation-associated microangiopathy, TAM*)

Częstość występowania TAM wynosi od 4% do 13% [19]. Pierwsze doniesienie na temat TAM, w 1980 roku, pojawiło się krótko po tym jak po raz pierwszy zastosowano CsA w profilaktyce GvHD. Śmiertelność kształtuje się od 12% do 85%. Niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi są: wczesny początek (do +120 doby po allo-HSCT), stosowanie CsA lub takrolimusu, wykładniki niewydolności nerek oraz objawy neurologiczne w przebiegu TAM.

Wymienia się następujące czynniki ryzyka TAM: płeć żeńską, allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego oraz transplantacje haploidentyczne, immunosupresję z zastosowaniem CsA lub Takrolimusu, FTBI, GvHD, infekcje (wirusowe, grzybicze) [19].

Cechą charakterystyczną TAM jest gromadzenie się wewnątrznaczyniowo agregatów płytkowych, otoczonych czynnikiem von Willebranda (vWF), o nieprawidłowej strukturze i wielkości budujących go multimerów tzw. unusually large vWF (ULvWF). ULvWF ma większe powinowactwo do glikoproteiny 1b-IX-V na powierzchni płytek krwi. Sprzyja to tworzeniu się agregatów płytkowych [66, 67]. Poza tym w osoczu pacjentów TAM obserwowano podwyższony poziom tkankowego aktywatora plazminogenu, interleukiny 1 i 6, receptora dla interleukiny 2 i TNF [68].

Zasady diagnostyczne oraz terapeutyczne stosowane w TAM przedstawiono szczegółowo w rozdziale 3.5.2.

1.5.3. Zespół przeziąkania włóściczek (*ang. capillary leak syndrome, CLS*)

CLS powstaje na wskutek uszkodzenia śródbłonek mieloablacyjną terapią kondycjonującą. Częstość występowania po allo-HSCT dotychczas nie została ustalona (w pojedynczych doniesieniach nawet u 20% biorców allo-HSCT). Objawy kliniczne wynikają z ucieczki płynów przez uszkodzony śródbłonek do przestrzeni międzykomórkowej i obejmują: przyrost masy ciała $>3\%$ w ciągu 24 godzin oraz uogólnione obrzęki (wodobrzusze, płyn w opłucnej oraz w osierdziu). Warunkiem rozpoznania jest wystąpienie powyższych objawów w pierwszych 15 dniach po HSCT. Szczególnym ryzykiem obarczeni są pacjenci przygotowywani do HSCT FTBI oraz biorcy MUD. Śmiertelność jest wysoka, bowiem CLS szybko ewoluuje w kierunku zespołu niewydolności wielonarządowej [20].

1.5.4. Powikłania infekcyjne po HSCT

Okres okołoprzeszczepowy, to ze względu na mieloablację i immunosupresję wywołaną kondycjonowaniem, a także immunosupresyjny efekt profilaktyki GvHD, to czas szczególnej podatności pacjenta na zakażenia wirusowe, grzybicze i bakteryjne, które w przypadku tych dwóch ostatnich mogą przebiegać pod postacią zagrażającej życiu posocznicy. Dodatkowo ryzyko infekcji rośnie w związku z toksycznym uszkodzeniem błon śluzowych jamy ustnej i przewodu pokarmowego przez FTBI i/lub megachemioterapię oraz przerwaniem ciągłości powłok skórnych w następstwie instalacji centralnego cewnika żylnego. Ryzyko wystąpienia zakażeń po HSCT jest wypadkową zaburzeń różnych mechanizmów odporności przeciwwakaźnej i zmienia się w czasie po HSCT, a w kolejnych tygodniach po zabiegu tworzy różne konstelacje. W

pierwszym okresie tj. do około 30 dnia po HSCT, kiedy szpik podejmuje funkcję krwiotworzenia, pacjenci przede wszystkim predysponowani są do zakażeń bakteryjnych (głównie Gram dodatnich). Wynika to w pierwszym rzędzie z braku granulocytów obojętnochłonnych, uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej i przewodu pokarmowego oraz przerwania ciągłości powłok skórnych i stosowania centralnego dostępu żylnego. U pacjentów leczonych z powodu GvHD wysokimi dawkami kortykosteroidów, czasami także w połączeniu z ATG, poważny problem stanowią również zakażenia grzybicze [69]. Drugi okres, po podjęciu przez szpik czynności krwiotworzenia tj. w 2 i 3 miesiącu po HSCT, normalizuje się liczba granulocytów obojętnochłonnych, funkcje cytotoksyczne i zdolność do fagocytozy wracają do normy (zazwyczaj około 100 doby po przeszczepieniu). Ilość komórek NK we krwi 2-3 miesiące po HSCT u większości pacjentów jest prawidłowa. W okresie tym utrzymujący się głęboki niedobór odporności komórkowej i humoralnej sprzyja występowaniu zakażeń wirusowych, zwłaszcza spowodowanych CMV oraz zakażeń grzybiczych. Najczęściej zakażenie CMV ma charakter reaktywacji wcześniej przebytego zakażenia. U około 5% biorców allo-HSCT pomimo stosowanej profilaktyki (Acyklovir) oraz wczesnego leczenia (Gancyklovir, Foscavir, Cidofovir) rozwija się jawna choroba CMV, która może manifestować się śródmiąższowym zapaleniem płuc, zapaleniem wątroby, zapaleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego, zapaleniem mózgu [70-72]. W trzecim okresie, po upływie 100 dni od HSCT na status immunologiczny mają wpływ przede wszystkim: tempo rekonstrukcji w zakresie linii B i T komórkowej oraz obecność cGvHD. Nieprawidłowy stosunek limfocytów CD4+ do CD8+ sprzyja zakażeniom wirusowym, zwłaszcza wywoływanym przez wirus ospy wietrznej i półpaśca. Dodatkowo spostrzegany niedobór niektórych podklas immunoglobulin (IgG2 i IgG4) predysponuje do infekcji bakteriami otoczkowymi

(*Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*). Przyjmuje się, że rekonstytucja układu odpornościowego po HSCT trwa conajmniej 1 - 2 lata [72].

W okresie od HSCT do podjęcia przez szpik krwiotworzenia charakterystyczna jest obwodowa pancytopenia (anemia, neutropenia, trombocytopenia). Konsensus Immunocompromised Host Society definiuje neutropenię jako liczbę leukocytów (*ang. white blood count, WBC*) poniżej 1000 komórek/mm³ lub liczbę neutrofilii poniżej 500 komórek/mm³. Gorączkę w czasie neutropenii, nazwaną gorączką neutropeniczną określa stan podwyższonej ciepłoty ciała >38°C trwający conajmniej 1 godzinę lub stan podwyższonej ciepłoty ciała >38°C dwukrotnie, w odstępie 12 godzin lub stan podwyższonej ciepłoty ciała >38,3°C niezależnie od czasu jego trwania. Około 40% gorączek neutropenicznych stanowi gorączka o nieznannej etiologii (*ang. fever of unknown origin, FUO*), czyli gorączka trwająca ponad 3 dni, której czynnik patogenetyczny nie został ustalony. Gorączka neutropeniczna przebiegająca ze stanem podwyższonej ciepłoty ciała >38°C lub obniżonej ciepłoty ciała <36°C oraz objawami towarzyszącymi, takimi jak: tachykardia, tachypnoe lub hypokapnia, z dodatnim posiewem krwi nazywamy posocznicą. W ciężkiej posocznicy dodatkowo obserwuje się objawy związane z hipoperfuzją (oliguria, hipoksemia, kwasica metaboliczna). A we wstrząsie septycznym hipotensję [73, 74].

Analiza częstości występowania gorączki neutropenicznej wśród dzieci po zabiegu allo-HSCT przez szereg zespołów badawczych m. in. Dell'Orto et al. [75]; Mullen et al. [76]; wskazuje na występowanie tego objawu u 100% pacjentów na pediatrycznych oddziałach transplantacji szpiku kostnego. Wśród około 35% pacjentów po allo-HSCT obserwuje się FUO, 33% gorączkę związaną z bakterią, 24% gorączkę, której źródłem jest zakażony cewnik centralny, 5% gorączkę spowodowaną zapaleniem płuc, 3% gorączkę innego pochodzenia np. zakażenie dróg moczowych

[75]. U ponad 2/3 przypadków dzieci z bakteriami czynnikiem etiologicznym są bakterie Gram dodatnie (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus alpha-hemolyticus*). Do zakażenia nimi dochodzi najczęściej poprzez cewnik centralny, rzadziej przez uszkodzoną błonę śluzową jamy ustnej lub przewodu pokarmowego. Rzadziej zakażenia wywołują bakterie Gram ujemne (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. i *Pseudomonas aeruginosa*) oraz grzyby (*Candida* spp; *Aspergillus* spp.) [74-76]. Czas występowania objawów gorączki neutropenicznej jest najkrótszy wśród biorców HSC z PB, najdłuższy natomiast u biorców CB. Czas trwania gorączki neutropenicznej jest związany z czasem jaki upłynął od zabiegu allo-HSCT a przyjęciem przeszczepionych HSC i jest on najdłuższy dla przeszczepów z CB [77-80].

1.5.5. Zespół niewydolności wielonarządowej (*ang. multiple-organ dysfunction syndrome, MODS*)

Okolo 4% do 44% biorców komórek krwiotwórczych wymaga hospitalizacji na oddziałach intensywnej terapii (*ang. pediatric intensive care unit, PICU*) [81]. Prawdopodobieństwo przyjęcia dziecka do PICU po allo-HSCT obliczono na 33,5±5,4% [82]. Śmiertelność pacjentów pediatrycznych, w PICU, po allo-HSCT wynosi od 25% do 91% [81] i jest większa dla pacjentów wymagających wentylacji mechanicznej i wynosi od 83% do 96% [83]. Główne przyczyny hospitalizacji w PICU stanowią: niewydolność oddechowa (spowodowana najczęściej zapaleniem płuc, ARDS), niewydolność krążenia, niewydolność nerek, zaburzenia neurologiczne (drgawki uogólnione), wstrząs septyczny oraz MODS [84, 85]. MODS jest stanem, w którym dochodzi do niewydolności dwóch lub więcej narządów/układów. Zespół ten obejmuje występowanie utrzymujących się poważnych zaburzeń czynności narządów u

osób w ostrej fazie choroby, z powodu której niemożliwe jest utrzymanie homeostazy ustrojowej bez interwencji leczniczej. MODS może pojawić się w przebiegu posocznicy, VOD, TAM, CLS i innych wczesnych powikłań HSCT [20].

1.6. Przyczyny niepowodzeń transplantacji komórek krwiotwórczych u dzieci i młodzieży

Według raportu Center for International Blood and Marrow Transplant Research z 2005 roku najczęstszą przyczyną niepowodzeń allo-HSCT u biorców z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego jest wznowa choroby podstawowej i dotyczy 34% pacjentów po MSD-HSCT oraz 23% po UD-HSCT. Innymi przyczynami niepowodzeń allo-HSCT w tej grupie pacjentów są: zakażenia (17% po MSD-HSCT; 21% po UD-HSCT), GvHD (15% zarówno po MSD-HSCT, jak i po UD-HSCT) oraz toksyczność narządowa zastosowanego kondycjonowania (14% po MSD-HSCT; 15% po UD-HSCT). Wśród pacjentów z rozpoznaniem choroby nierozrostowej najczęstszymi przyczynami niepowodzeń allo-HSCT są: zakażenia, GvHD oraz powikłania toksyczne. Według raportu EBMT Pediatric Diseases Working Party z 2007 r. w latach 2000-2002 w dniu +100 po transplantacji śmiertelność związana z procedurą transplantacyjną (*ang. transplant related mortality; TRM*) wynosiła 5% po MSD-HSCT, 14% po MUD-HSCT [86]. Wykazano, że we wczesnym okresie potransplantacyjnym (to jest do 100 dni po przeszczepieniu) największe ryzyko wystąpienia powikłań allo-HSCT występuje przede wszystkim u dzieci powyżej 10 roku życia, u których wykonano zabieg MUD-HSCT oraz u dzieci z zaawansowaną chorobą nowotworową [61].

Pomimo nieustannego doskonalenia procedury skuteczność HSCT jest nadal ograniczona, a zatem optymalizacja prep-reg, tj. poprawa jego efektu mieloablacyjnego i/lub immunosupresyjnego, a w przypadku chorób rozrostowych także jego efektu przeciwnowotworowego oraz minimalizacja toksyczności narządowej, a poprzez to zmniejszenie śmiertelności związanej z procedurą transplantacyjną oraz poprawa efektywności i odległych wyników allo-HSCT, to podstawowe i wciąż aktualne wyzwanie dla transplantologów zajmujących się przeszczepianiem komórek hematopoetycznych. Idealne kondycjonowanie to takie, które wykazywałoby niewielką, niezagrażającą życiu toksyczność narządową przy jednocześnie dobrym efekcie mieloablacyjnym, a w przypadku chorób rozrostowych także przeciwnowotworowym. Kondycjonowanie o tzw. zredukowanej intensywności (*ang. reduced intensity conditioning, RIC*), tj. niemieloablacyjne, które znajduje zastosowanie zarówno u biorców z chorobami rozrostowymi, jak i nierozrostowymi, charakteryzuje się niewielką toksycznością narządową, ale nadal poważnym problemem w tej grupie biorców pozostają niepowodzenia HSCT ze względu na wznowę choroby nowotworowej, ostra i przewlekła GvHD oraz powikłania infekcyjne. Znaczący udział w ogólnej śmiertelności potransplantacyjnej zarówno powikłań infekcyjnych, jak i związanych z toksycznością prep-reg oraz udział wielu czynników krzepnięcia w patogenezie tych powikłań, w tym PC, PS i TM stanowi o aktualności działań dążących do zmniejszenia TRM z powodu tych powikłań.

2. CEL PRACY

- 2.1. Ocena aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny przed allo-HSCT oraz we wczesnym okresie potransplantacyjnym w zależności od: wskazań do allo-HSCT, typu dawcy allo-HSC, kondycjonowania do allo-HSCT.
- 2.2. Ocena aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny u biorców z mikroangiopatią zakrzepową (TAM), zespołem przesiąkania włóscinek (CLS), gorączką o nieustalonej etiologii (FUO), posocznicą, zespołem niewydolności wielonarządowej (MODS) we wczesnym okresie po allo-HSCT.
- 2.3. Ocena występowania APCr w okresie przedtransplantacyjnym i jej wpływu na występowanie potransplantacyjnych powikłań zakrzepowo-zatorowych (VOD, TAM).

3. PACJENCI I METODY

3.1. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych

Do badania włączono ogółem 29 dzieci z chorobami rozrostowymi (n=25; 86,2%) i nierozrostowymi (n=4; 13,8%) w wieku od 1,7 lat do 17,1 lat (mediana 8,9 lat), poddanych allo-HSCT od dawców rodzinnych oraz niespokrewnionych na Oddziale Transplantacji Szpiku, Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w okresie od 1 października 2008 do 31 grudnia 2010. Z badania wykluczono niemowlęta poniżej 6 miesiąca życia.

Charakterystykę biorców w poszczególnych grupach omówiono w dalszej części rozdziału.

3.1.1. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych z chorobami rozrostowymi

Allo-HSCT w okresie od października 2008 do grudnia 2010 wykonano u 25 (86,2%) pacjentów z chorobami rozrostowymi w wieku od 1,7 do 17,1 lat (mediana 8,8 lat). W badanej grupie było 11 (44%) dziewczynek i 14 (56%) chłopców. Szczegółową charakterystykę biorców HSC z chorobami rozrostowymi przedstawiono w Tabeli 3.1.1.

Tabela 3.1.1. Pacjenci z chorobami rozrostowymi poddani allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych (n=25; 86,2%)

L.p.			Liczba pacjentów
1	Płeć	Dziewczynki Chłopcy	11 (44%) 14 (56%)
2	Wiek	8,8 (1,7-17,1) lat	
3	Rozpoznanie	ALL AML + sAML BAL CML HLH	12 (48%) 8 (32%) 3 (12%) 1 (4%) 1 (4%)
4	Typ dawcy	MSD MUD Haplo	12 (48%) 12 (48%) 1 (4%)
5	Źródło komórek krwiotwórczych	BM PB	14 (56%) 11 (44%)
6	Dawka komórek CD34+	4,5 x 10 ⁶ /kg (1,5-12 x 10 ⁶ /kg)	

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

AML – ostra białaczka szpikowa,

sAML – wtórna ostra białaczka szpikowa,

BM – szpik kostny,

BAL – ostra białaczka bifenotypowa,

CML – przewlekła białaczka szpikowa,

Haplo – dawca haploidentyczny,

HLH – limfocystoza hemofagocytarna,

MSD – rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA,

PB – krew obwodowa.

Allo-HSCT wykonano z następujących wskazań: ostra białaczka limfoblastyczna (n=12; 48%), ostra białaczka szpikowa (n=8; 32%), ostra białaczka bifenotypowa (n=3; 12%), przewlekła białaczka szpikowa (n=1; 4%) oraz limfohistiocytoza hemofagocytarna (n=1; 4%). Wykonano 12 (48%) MSD-HSCT, 12 (48%) MUD-HSCT oraz 1 (4%) haploidentyczną HSCT. Źródłem komórek krwiotwórczych u 14 (56%) dzieci był szpik kostny, u 11 (44%) była krew obwodowa. Przeszczepiono $1,5-12 \times 10^6$ komórek CD34+/kg masy ciała biorcy (mediana: $4,5 \times 10^6$).

3.1.2. Charakterystyka biorców komórek krwiotwórczych z chorobami nierozrostowymi

Od października 2008 do grudnia 2010 allo-HSCT wykonano u 4 (13,8%) pacjentów z chorobami nierozrostowymi w wieku od 4,1 do 17,1 lat (mediana 8,9 lat). W badanej grupie były 1 (25%) dziewczynki i 3 (75%) chłopców. Szczegółową charakterystykę pacjentów z chorobami nierozrostowymi przedstawiono w Tabeli 3.1.2.

Tabela 3.1.2. Pacjenci z chorobami nierozrostowymi poddani allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (n=4; 13,8%)

L.p.			Liczba pacjentów
1	Płeć	Dziewczynki Chłopcy	1 (25%) 3 (75%)
2	Wiek	8,9 (4,1-17,1) lat	
3	Rozpoznanie	SAA Adrenoleukodystrofia	2 (50%) 2 (50%)
4	Typ dawcy	MUD MSD Haplo	2 (50%) 1 (25%) 1 (25%)
5	Źródło komórek krwiotwórczych	PB BM CB	3 (75%) 0 (0%) 1 (25%)
6	Dawka komórek CD34+	4,6 x 10 ⁶ /kg (0,6-9 x 10 ⁶ /kg)	

BM – szpik kostny,

CB – krew pępowinowa,

Haplo – dawca haploidentyczny,

MSD – rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA,

PB – krew obwodowa,

SAA – ciężka nabyta anemia aplastyczna.

Allo-HSCT wykonano z następujących wskazań: ciężka nabyta anemia aplastyczna (n=2; 50%), adrenoleukodystrofia (n=2; 50%). Wykonano 2 (50%) MUD-HSCT, 1 (25%) MSD-HSCT oraz 1 (25%) haploidentyczną HSCT. Źródłem komórek krwiotwórczych u 3 (75%) dzieci była krew obwodowa, u 1 (25%) krew pępowinowa. Przeszczepiono 0,6-9 x 10⁶/kg masy ciała biorcy komórek CD34+ (mediana: 4,6 x 10⁶).

3.2. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna stosowana przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych

3.2.1. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna stosowana przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych u pacjentów z chorobami rozrostowymi

3.2.1.a. Pacjenci, u których w terapii mieloablacyjno-immunosupresyjnej przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych zastosowano frakcjonowane napromienienie całego ciała

Dane dotyczące mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii u dzieci, u których w terapii mieloablacyjno-immunosupresyjnej przed allo-HSCT zastosowano FTBI przedstawiono w tabeli 3.2.1.a.

Tabela 3.2.1.a. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna z zastosowaniem frakcjonowanego napromienienia całego ciała (n=9; 36%)

L.p.	Pacjent	Faza choroby	Typ Dawcy	Składnik terapii i jego dawka			
				FTBI (Gy) Dni przed HSCT	VP-16 (mg/kg) Dzień przed HSCT	Cy (mg/kg) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	WF	ALL CR1	MSD	6 x 2 (-6)-(-4)	1 x 60 (-3)	-	-
2	PŚ	ALL CR2	MSD	6 x 2 (-6)-(-4)	1 x 60 (-3)	-	-
3	PP	ALL CR2	MSD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 60 (-4)	-	-
4	KK	ALL CR1	MSD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 60 (-4)	-	-
5	MH	ALL CR2	MSD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 60 (-4)	-	-
6	JP	ALL CR1	MUD	6 x 2 (-8)-(-6)	1 x 60 (-5)	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
7	MS	ALL CR1	MUD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 60 (-4)	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
8	AK	BAL CR2	MSD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 40 (-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-
9	DG	BAL CR2	MUD	6 x 2 (-7)-(-5)	1 x 40 (-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	ATG 4 x 2,5 mg/kg

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

BAL – ostra białaczka bifenotypowa,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Cy – cyklofosfamid,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

MSD – rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA,

VP-16 – etopozyd.

3.2.1.b. Pacjenci, u których w terapii mieloablacyjno-immunosupresyjnej przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych zastosowano busulfan

Szczegółowe dane dotyczące mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii z Bu przedstawiono w tabeli 3.2.1.b.

Tabela 3.2.1.b. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna z zastosowaniem busulfanu (n=11; 44%)

L.p.	Pacjent	Faza choroby	Typ dawcy	Składnik terapii i jego dawka				
				Bu (mg/kg) Dni przed HSCT	Cy (mg/kg) Dni przed HSCT	VP-60 (mg/kg) Dni przed HSCT	Mel (mg/m ²) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	MC	ALL CR1	MSD	16 x 1,1 (-9)-(-5)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	-
2	NK	ALL CR1	MUD	16 x 1,2 (-8)-(-5)	2 x 60 (3)-(-2)	1 x 40 (-4)	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
3	SS	ALL CR2	MUD	16 x 1,2 (-9)-(-5)	2 x 60 (3)-(-2)	1 x 40 (-4)	-	ATG 3 x 2,5 mg/kg
4	NG	AML CR1	MSD	16 x 0,95 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	-
5	RP	AML CR1	MSD	16 x 1,1 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	-
6	IK	AML CR2	MUD	16 x 0,8 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
7	KR	AML CR2	MUD	16 x 1,2 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
8	MW	AML CR1	MSD	16 x 1,2 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	-
9	DO	sAML CR1	MUD	16 x 0,8 (-10)-(-6)	2 x 60 (-5)-(-4)	-	100 (-2)	ATG 3 x 2,5 mg/kg
10	ZS	sAML CR1	MUD	16 x 1,1 (-8)-(-4)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	100 (-1)	ATG 3 x 2,5 mg/kg
11	DP	CML CP1	MSD	16 x 0,95 (-8)-(-5)	2 x 60 (-3)-(-2)	-	-	-

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

AML – ostra białaczka szpikowa,

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

BAL – ostra białaczka bifenotypowa,

Bu – busulfan,

CML – przewlekła białaczka szpikowa,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Cy – cyklofosfamid,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

Mel - melfalan

MSD – rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA,

VP-16 – etopozyd.

3.2.1.c. Pacjenci, u których w terapii mieloablacyjno-immunosupresyjnej przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych zastosowano treosulfan

Szczegółowe dane dotyczące mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii z TRS przedstawiono w tabeli 3.2.1.c.

Tabela 3.2.1.c. Terapija mieloablacyjno-immunosupresyjna z zastosowaniem treosulfanu (n=4; 16%)

L.p.	Pacjent	Jednostka chorobowa	Typ Dawcy	Składnik terapii i jego dawka			
				TRS (g/m ²) Dni przed HSCT	Flu (mg/m ²) Dni przed HSCT	TT (mg/kg) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	HS	ALL CR1	MUD	3 x 14 (-7)-(-5)	5 x 30 (-7)-(-3)		ATG 3 x 2,5 mg/kg
2	AM	AML CR2	HAPLO	3 x 14 (-7)-(-5)	5 x 30 (-7)-(-4)	2 x 5 (-5)-(-4)	ATG 4 x 2,5 mg/kg
3	NS	BAL CR2	MSD	3 x 14 (-7)-(-5)	5 x 30 (-7)-(-3)	2 x 5 (-4)-(-3)	-
4	JŻ	HLH	MUD	3 x 14 (-6)-(-4)	5 x 30 (-6)-(-2)	-	Campath-1H 1 mg/kg

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

AML – ostra białaczka szpikowa,

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

BAL – ostra białaczka bifenotypowa,

Campath-1H – przeciwciało monoklonalne przeciwko antygenowi CD52,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Flu - fludarabina,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

Haplo – dawca haploidentyczny,

HLH – limfocystoza hemofagocytarna,

MSD – rodzeństwo w pełni zgodne w układzie HLA,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA,

TRS – treosulfan,

TT – tiotepa.

3.2.1.d. Pacjent z chorobą rozrostową, u którego zastosowano terapię nie-mieloablacyjną przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych

Szczegóły terapii nie-mieloablacyjnej przedstawiono w Tabeli 3.2.1.d.

Tabela 3.2.1.d. Terapia nie-mieloablacyjna (n=1; 4%)

L.p.	Pacjent	Jednostka chorobowa	Typ Dawcy	Składnik terapii i jego dawka	
				Flu (mg/m ²) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	JP	ALL CR1	MUD	5 x 30 (-7)-(-3)	ATG 4 x 2,5 mg/kg

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

CR1 – pierwsza remisja,

Flu - fludarabina,

MUD - dawca niespokrewniony w pełni zgodny w układzie HLA.

3.2.2. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna stosowana przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych u pacjentów z chorobami nierozrostowymi

3.2.2.a. Pacjenci z ciężką nabytą niedokrwistością aplastyczną

Terapia immunoablacyjna, którą zastosowano u pacjentów z SAA przed HSCT została przedstawiona w tabeli 3.2.2.a

Tabela 3.2.2.a. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna u dzieci z ciężką nabytą niedokrwistością aplastyczną (n=2; 50%)

L.p.	Pacjent	Typ dawcy	Składnik terapii i jego dawka		
			Flu (mg/m ²) Dni przed HSCT	Cy (mg/kg) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	AN	MSD	-	2 x 60 (-5)-(-2)	ATG 4 x 2,5 mg/kg
2	KBG	MUD	5 x 30 (-7)-(-3)	-	Campath-1H 1 mg/kg

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

Campath-1H – przeciwciało monoklonalne przeciwko antygenowi CD52,

Cy – cyklofosfamid,

Flu – fludarabina.

3.2.2.b. Pacjenci z adrenoleukodystrofią

Zastosowaną u pacjentów z ALD terapię mieloablacyjno-immunosupresyjną przedstawiono w tabeli 3.2.2.b.

Tabela 3.2.2.b. Terapia mieloablacyjno-immunosupresyjna u dzieci z adrenoleukodystrofią (n=2; 50%)

L.p.	Pacjent	Faza choroby	Typ dawcy	Składnik terapii i jego dawka				
				Bu (mg/kg) Dni przed HSCT	Flu (mg/m ²) Dni przed HSCT	TRS (g/m ²) Dni przed HSCT	TT (mg/kg) Dni przed HSCT	T-deplecja in vivo
1	KT	asympto	MUD	-	5 x 30 (-6)-(-2)	3 x 10 (-7)-(-5)	-	ATG 4 x 2,5 mg/kg
2	KT	asympto	Haplo	16 x 1 (-9)-(-6)	5 x 30 (-6)-(-2)	-	2 x 5 (-3)-(-2)	Campath-1H 1 mg/kg

*asympto – faza asymptomatyczna,

ATG – globulina przeciwtymocytarna,

Campath-1H – przeciwciało monoklonalne przeciwko antygenowi CD52,

Cy – cyklofosfamid,

Flu – fludarabina,

TRS – treosulfan.

3.3. Kryteria oceny przyjęcia przeszczepu i rekonstrukcji krwiotworzenia

Stosowano niżej wymienione kryteria przyjęcia, braku przyjęcia lub odrzucenia przeszczepu:

1. przyjęcie przeszczepu (liczba granulocytów obojętnochłonnych $\geq 0,5 \times 10^9/l$ przez 3 kolejne dni i/lub liczba krwinek płytkowych $\geq 20 \times 10^9/l$ utrzymująca się

przez kolejne 7 dni bez konieczności przetoczeń koncentratu krwinek płytkowych);

2. brak przyjęcia przeszczepu – brak wzrostu liczby granulocytów obojętnochłonnych $\geq 0,5 \times 10^9/L$ do co najmniej 28 dnia po transplantacji;

3. odrzucenie przeszczepu – obniżenie się liczby granulocytów obojętnochłonnych $< 0,2 \times 10^9/L$ przez co najmniej 3 kolejne dni po wcześniej obserwowanych wykładnikach przyjęcia przeszczepu.

3.4. Profilaktyka, rozpoznawanie i występowanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD)

3.4.1. Profilaktyka GvHD

3.4.1.a. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami rozrostowymi poddanych MSD-HSCT

W profilaktyce GvHD stosowano CsA w dwugodzinnym wlewie dożylnym dwa razy na dobę od dnia poprzedzającego przeszczepienie komórek krwiotwórczych. Postać dożylną CsA zastępowano postacią doustną po ustąpieniu objawów toksyczno-zapalnych w obrębie przewodu pokarmowego. CsA stosowano do 60 doby po allo-HSCT u pacjentów z ALL, AML, BAL, natomiast do 100 doby po allo-HSCT u dzieci z CML. Utrzymywano poziom CsA od 110 ng/ml do 130 ng/ml.

U wszystkich pacjentów po MSD-HSCT z powodu chorób rozrostowych GvHD zapobiegano wyłącznie przy użyciu CsA.

3.4.1.b. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami rozrostowymi poddanych MUD-HSCT

W profilaktyce GvHD stosowano CsA początkowo we wlewie dożylnym, a następnie w postaci doustnej, utrzymując jej poziom w zakresie od 130 ng/ml do 150 ng/ml. U pacjentów z ALL, AML, BAL CsA utrzymywano do 80 doby po allo-HSCT, natomiast u dzieci z HLH do 100 doby po allo-HSCT. Dzieci z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego poddane allo-HSCT od dawcy niespokrewnionego otrzymały dodatkowo MTX w dawce 10 mg/m^2 i.v. w 1, 3, i 6 dobie po allo-HSCT oraz Leucovorin-Calcium 15 mg/m^2 w dobie 2, 4 i 7.

U wszystkich pacjentów po MUD-HSCT, GvHD zapobiegano podając CsA i MTX. Ponadto w celu uzyskania efektu T-deplecji *in vivo* u 11 (91,7%) pacjentów zastosowano ATG w dawce sumarycznej od 7,5 mg/kg do 10 mg/kg. U 1 (8,3%) pacjenta podano Campath w dawce 1 mg/kg.

3.4.1.c. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami rozrostowymi poddanych Haplo-HSCT

U pacjenta poddanego Haplo-HSCT w celu uzyskania efektu T-deplecji *in vivo* zastosowano ATG w dawce 10 mg/kg. Nie stosowano natomiast immunosupresji w okresie potransplantacyjnym.

3.4.1.d. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami nierozrostowymi poddanych MSD-HSCT

Spośród 4 pacjentów z chorobami nierozrostowymi u 1 wykonano MSD-HSCT. Był to pacjent z SAA. W profilaktyce GvHD zastosowano CsA do 100 doby po allo-HSCT. Utrzymywano poziom CsA od 130 ng/ml do 150 ng/ml. Dodatkowo podano MTX w dawce 10 mg/m² i.v. w 1, 3, i 6 dobie po allo-HSCT oraz Leucovorin-Calcium 15 mg/m² w dobie 2, 4 i 7. W celu uzyskania efektu T-deplecji *in vivo* zastosowano ATG w dawce sumarycznej 10 mg/kg.

3.4.1.e. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami nierozrostowymi poddanych MUD-HSCT

W badanej grupie profilaktykę GvHD prowadzono przy pomocy CsA do 100 doby po allo-HSCT i MTX w dawce 10 mg/m² i.v. w 1, 3, i 6 dobie po allo-HSCT oraz Leucovorin-Calcium 15 mg/m² w dobie 2, 4 i 7 (n=1). Jednemu pacjentowi podawano CsA łącznie z kortykosteroidami. U pacjenta z adrenoleukodystrofią CsA stosowano do doby +80. Poziom CsA utrzymywano od 130 ng/ml do 150 ng/ml.

Ponadto w celu uzyskania efektu T-deplecji *in vivo* 1 pacjent poddany MUD-HSCT otrzymał dodatkowo ATG w dawce sumarycznej 10 mg/kg, a 1 pacjent przeciwciało monoklonalne anti-CD52 w dawce 1 mg/kg.

3.4.1.f. Profilaktyka GvHD u pacjentów z chorobami nierozrostowymi poddanych Haplo-HSCT

Pacjent przed Haplo-HSCT w celu uzyskania efektu T-deplecji *in vivo* otrzymał przeciwciało monoklonalne anti-CD52 w dawce 1 mg/kg. Nie stosowano natomiast immunosupresji w okresie potransplantacyjnym.

3.4.2. Rozpoznawanie aGvHD

Stopień nasilenia aGvHD, w skali 0-IV°, oceniano według kryteriów zaproponowanych przez Glucksberga i wsp. [87], a zmodyfikowanych przez Deega i wsp. [88].

Tabela 3.4.2. Ocena nasilenia aGvHD wg Gluksberga i Deega

Zajęcie poszczególnych narządów	Łączny stopień nasilenia aGvHD						
	Narząd	Objawy	Natężenie	Stopień	I°	II°	III°
Skóra	rumień skóry (% pow. ciała)	< 25%	1+	X	X		
	rumień skóry (% pow. ciała)	25 - 50%	2+	X	X	X	X
	rumień skóry (% pow. ciała)	> 50%	3+		X	X	X
	złuszczenie skóry		4+				X
Przewód pokarmowy	biegunka (ml/dzień)	> 500	1+		X		
	biegunka (ml/dzień)	> 1000	2+			X	X
	biegunka (ml/dzień)	> 1500	3+			X	X
	ból brzucha i niedrożność		4+				X
Wątroba	bilirubina (mg/dl)	2,0 – 3,0	1+		X		
	bilirubina (mg/dl)	3,1 – 6,0	2+			X	X
	bilirubina (mg/dl)	6,1 – 15,0	3+			X	X
	bilirubina (mg/dl)	> 15	4+				X
Stan ogólny	Pogorszenie		1+		X		
	Pogorszenie		2+			X	
	Pogorszenie		3+				X

3.4.3. Występowanie aGvHD

Ostrą chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi obserwowano u 58,6% (n=17) biorców komórek krwiotwórczych. Manifestację aGvHD ze strony skóry obserwowano u 17 (58,6%) pacjentów (I°, n=2; II°, n=11; III°, n=4; IV°, n=0). Objawy ze strony przewodu pokarmowego występowały u 4 (23,5%) pacjentów z aGvHD (I°, n=1; II°, n=0; III°, n=3; IV°, n=0). U 1 spośród 17 (5,9%) pacjentów z aGvHD obserwowano wykładniki zajęcia wątroby (I°, n=1; II°, n=0; III°, n=0; IV°, n=0). Stopień nasilenia aGvHD ze strony poszczególnych narządów przedstawia Tabela 3.4.3.a.

Tabela 3.4.3.a. Występowanie aGvHD wg Gluksberga i Deega w badanej grupie (n=17; 58,6%)

CHOROBY ROZROSTOWE					
Zajęcie poszczególnych narządów	Liczba Pacjentów	Stopień nasilenia aGvHD			
		I°	II°	III°	IV°
Skóra	16 (94,1%)	1 (5,9%)	11 (64,7%)	4 (23,6%)	0
Przewód pokarmowy	4 (23,6%)	1 (5,9%)	0	3 (17,6%)	0
Wątroba	1 (5,9%)	1 (5,9%)	0	0	0
CHOROBY NIEROZROSTOWE					
Zajęcie poszczególnych narządów	Liczba Pacjentów	Stopień nasilenia aGvHD			
		I°	II°	III°	IV°
Skóra	1 (5,9%)	1 (5,9%)	0	0	0
Przewód pokarmowy	0	0	0	0	0
Wątroba	0	0	0	0	0

Objawy aGvHD ze strony jednego narządu docelowego (skóry) występowały u 17 (100%) pacjentów z aGvHD. Objawy z 2 lub 3 narządów docelowych jednocześnie obserwowano u 5 (29,4%) pacjentów z aGvHD. Po uwzględnieniu stopnia zajęcia poszczególnych narządów, aGvHD I° dotyczyła 11 (64,7%) pacjentów, II° 3 (17,6%) pacjentów, III° 3 (17,6%) pacjentów, IV° 0 pacjentów.

aGvHD obserwowano u pacjentów, u których allo-HSCT wykonano z następujących wskazań: ALL (n=10/12; 83,3%), AML (n=1/6; 16,7%), sAML (2/2; 100%), BAL (n=2/3; 66,7%), CML (n=1/1; 100%), limfohistiocytoza hemofagocytarna (n=0/1; 0%), SAA (n=1/2; 50%), ALDX (n=0/2; 0%) – Tabela 3.4.3.b.

Tabela 3.4.3.b. Występowanie aGvHD w zależności od wskazań do HSCT (n=17; 58,6%)

Wskazanie do HSCT	Liczba Pacjentów	Stopień nasilenia aGvHD			
		I°	II°	III°	IV°
Choroby rozrostowe (n=25)	16 (64%)	10 (40%)	3 (12%)	3 (12%)	0
Choroby nierozrostowe (n=4)	1 (25%)	1 (25%)	0	0	0
Ogółem	17 (100%)	11 (64,7%)	3 (17,6%)	3 (17,6%)	0

aGvHD – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych.

3.5. Zapobieganie, rozpoznawanie, i leczenie wczesnych powikłań związanych z toksycnością procedury transplantacyjnej oraz uszkodzeniem śródbłonnków

Powikłaniom toksycznym po mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii kondycjonującej, zapobiegano zgodnie z wytycznymi EBMT [20].

3.5.1. Zapobieganie oraz klasyfikacja toksyczno-zapalnego uszkodzenia błon śluzowych jamy ustnej i przewodu pokarmowego

Przed rozpoczęciem kondycjonowania stosowano sanację uzębienia. Od około doby -14 przed HSCT zalecano płukanie jamy ustnej 0,1% roztworem chlorheksydyny. Do mycia zębów stosowano jałowe gaziki do czasu wzrostu liczby granulocytów obojętnochłonnych powyżej $1,0 \times 10^9/l$.

Pacjentom otrzymującym MTX w profilaktyce GvHD, w celu zapobieżenia toksycznemu uszkodzeniu błon śluzowych jamy ustnej i przewodu pokarmowego, po 24 godzinach od podania każdej kolejnej dawki MTX (doby: +1, +3, +6), podawano Calcium leukovorin (doby: +2, +4, +7). W sytuacjach znacznego, toksycznego uszkodzenia błon śluzowych jamy ustnej wywołanego kondycjonowaniem, odstępowano od kolejnych dawek MTX.

Leki doustne zastępowano ich odpowiednikami podawanymi dożylnie, u pacjentów, u których w związku z istniejącymi zmianami toksycznymi przewodu pokarmowego, występowały trudności w połykaniu oraz dolegliwości bólowe. Stosowano nienarkotyczne lub narkotyczne środki przeciwbólowe w stałym wlewie dożylnym celem łagodzenia dolegliwości bólowych.

Ponadto zmianom toksyczno-zapalnym w obrębie przewodu pokarmowego zapobiegano stosując dekontaminację oraz podając leki zobojętniające nadmiar kwasu solnego w soku żołądkowym oraz modyfikowano sposób odżywiania chorego w zależności od fazy leczenia i obserwowanych objawów.

3.5.2. Zapobieganie nudnościom i wymiotom

Antagoniści receptora 5-HT, najczęściej ondansetron, w dawce 5 mg/m²/dawkę co 6 do 8 godzin były stosowane, w celu zapobieżenia nudnościom i wymiotom obserwowanym podczas kondycjonowania.

3.5.3. Zapobieganie krwotocznemu zapaleniu pęcherza moczowego

Krwotocznemu zapaleniu pęcherza moczowego zapobiegano u pacjentów, u których w kondycjonowaniu stosowano cyklofosfamid, podając mesnę, we wlewie dożylnym, w dawce 160% dawki cyklofosfamidu. Ponadto stosowano obfite nawadnianie organizmu (3000 ml/m²/dobę) i wymuszanie diurezy (100-250 ml/m²/godz.) przy użyciu furosemidu.

3.5.4. Zapobieganie, rozpoznawanie i występowanie VOD w badanej grupie

3.5.4.a. Profilaktyka VOD

Profilaktykę VOD prowadzono poprzez monitorowanie poziomu antytrombiny III i jej substytucję w razie spadku aktywności poniżej 75% normy. W profilaktyce

VOD stosowano również dożylny stały wlew heparyny w dawce 100 U/kg m.c./dzień pod kontrolą badań koagulologicznych oraz liczby płytek krwi. Wlew przerywano, gdy liczby płytek krwi obniżyła się do $30 \times 10^9/l$. Ponadto stosowano kwas urodeoksycholowy w dawce 600-900 mg/dobę.

3.5.4.b. Kryteria diagnostyczne VOD

Rozpoznanie VOD stawiano na podstawie poniższych kryteriów:

1. Seattle - stwierdzenie w ciągu 20 od allo-HSCT 2 lub więcej następujących objawów: hiperbilirubinemia $>2\text{mg/dl}$, hepatomegalia lub ból w prawej okolicy podżebrowej, przyrost masy ciała $>2\%$ [20].
2. Baltimore - stwierdzenie w ciągu 21 od allo-HSCT hiperbilirubinemii $>2\text{mg/dl}$ oraz 2 lub więcej następujących objawów: hepatomegalia lub ból w prawej okolicy podżebrowej, wodobrzusze, przyrost masy ciała $>5\%$ [20].

W diagnostyce VOD pomocne było badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. Stwierdzenie upośledzonego lub wstecznego przepływu w żyłach wątrobowych potwierdzało rozpoznanie VOD.

3.5.4.c. Występowanie VOD w grupie badanej

W badanej grupie nie stwierdzono VOD.

3.5.5. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie TAM w badanej grupie

3.5.5.a. Kryteria diagnostyczne TAM

TAM diagnozowano w oparciu o kryteria zaproponowane przez Ruutu i wsp:

1. wykładniki anemii hemolitycznej (>4% schistocytów w rozmazie w krwi obwodowej, obniżony poziom hemoglobiny, obniżony poziom haptoglobiny, podwyższony poziom dehydrogenazy mleczanowej), 2. małopłytkowość, 3. gorączka o nieznannej etiologii, 4. wykładniki niewydolności nerek, 5. objawy neurologiczne [89].

W zależności od obserwowanych objawów klinicznych TAM oraz nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych wyróżniano:

Stopień 1: wykładniki anemii hemolitycznej bez innych objawów klinicznych,

Stopień 2: wykładniki anemii hemolitycznej oraz poziom kreatyniny przekraczający od 1 do 3 razy normę,

Stopień 3: wykładniki anemii hemolitycznej oraz poziom kreatyniny przekraczający >3 razy normę,

Stopień 4: wykładniki anemii hemolitycznej oraz niewydolność nerek wymagająca dializoterapii lub objawy encefalopatii [19].

3.5.5.b. Leczenie TAM

W leczeniu TAM stosowano: zastąpienie CsA lub takrolimusu, stosowanych w profilaktyce GvHD, mykofenolanem mofetilu oraz infuzję Defibrotide w dawce 4 x 10 mg/kg m.c. [20, 89].

3.5.5.c. Występowanie TAM w grupie badanej

TAM obserwowano wśród 3 z 29 (10,3%) pacjentów. Wśród pacjentów z TAM, zabieg allo-HSCT był wykonany w drugiej remisji BAL (n=2) oraz pierwszej remisji ALL (n=1). U 2 pacjentów (1. dziewczynka w wieku 6 lat, 2. chłopiec w wieku 15 lat) przeszczepiono szpik kostny od MSD (dawka przeszczepianych komórek krwiotwórczych CD34+ wynosiła $5,7 \times 10^6/\text{kg}$ oraz $2,7 \times 10^6/\text{kg}$ masy ciała biorcy). U 1 dziecka (dziewczynka w wieku 10 lat) przeszczepiono komórki z krwi obwodowej od MUD (dawka przeszczepianych komórek krwiotwórczych CD34+ wynosiła $7 \times 10^6/\text{kg}$ masy ciała biorcy). Do allo-HSCT wszyscy pacjenci przygotowywani byli za pomocą FTBI oraz VP-16. Dwóch pacjentów dodatkowo otrzymało Cy. Przed MUD-HSCT, celem T-deplecji *in vivo* podawano ATG *i.v.* W profilaktyce GvHD stosowano: CsA po MSD-HSCT, CsA oraz MTX po MUD-HSCT. TAM zdiagnozowano w +18, +33 oraz +36 dobie po HSCT. W przebiegu TAM cechy niewydolności nerek stwierdzono u 2 pacjentów, objawy neurologiczne natomiast u 1 pacjenta. Wlew CsA przerwano u wszystkich pacjentów. U 2 pacjentów po odstawieniu CsA, włączono MMF. U 1 pacjenta natomiast włączono FK506, który następnie ze względu na progresję objawów TAM, zastąpiono mykofenolanem mofetilu. Dodatkowo u wszystkich pacjentów zastosowano Defibrotide (10 mg/kg co 6 godzin). W wyniku zastosowanego leczenia u 2 pacjentów stwierdzono ustąpienie objawów klinicznych TAM, u 1 pacjentki natomiast obserwowano ewaluację TAM w MODS i zgon (doba + 78) – Tabela 3.5.5.c.

Tabela 3.5.5.c. TAM w badanej grupie (n=3; 10,3%)

	Pacjent	Rozpoznanie	Faza	Typ dawcy	Kondycjonowanie i T-deplecja	TAM doba po HSCT	Zastosowane leczenie
1	WF	ALL	CR1	MSD	FTBI, VP-16	18	CsA→MMF Defibrotide
2	AK	BAL	CR2	MSD	FTBI, VP-16, Cy	33	CsA→FK506→ MMF Defibrotide
3	DG	BAL	CR2	MUD	FTBI, VP-16, Cy, ATG	36	CsA→MMF Defibrotide ZGON

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

BAL - ostra białaczka bifenotypowa,

Cy – cyklofosfamid,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

CsA - cyklosporyna A,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

FK 506 – takrolimus,

MMF – mykofenolan mofetilu,

MSD - w pełni zgodny dawca rodzinny,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

VP-16 – etopozyd.

3.5.6. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie CLS w badanej grupie

3.5.6.a. Kryteria diagnostyczne oraz leczenie CLS

Rozpoznanie CLS stawiano na podstawie następujących objawów klinicznych: przyrost masy ciała >3% w ciągu 24 godzin oraz uogólnione obrzęki (wodobrzusze, płyn w opłucnej oraz w osierdziu). Warunkiem rozpoznania CLS było wystąpienie powyższych objawów w pierwszych 15 dniach po HSCT. W leczeniu stosowano kortykosteroidy [20].

3.5.6.b. Występowanie CLS w badanej grupie

CLS obserwowano u 3 (10,3%) dzieci (2 dziewczynki w wieku 6,5 oraz 14,6 lat, 1 chłopiec w wieku 16,5 lat), u których allo-HSCT wykonano z powodu sAML (n=2) oraz AML (n=1). 3 pacjentom przeszczepiono MUD-HSC pochodzące z PB (dawka przeszczepianych komórek krwiotwórczych CD34+ wynosiła $6,4 \times 10^6$, 9×10^6 oraz $9,4 \times 10^6$ /kg masy ciała). W przygotowaniu do HSCT u dzieci z sAML zastosowano Bu, Cy oraz Mel, natomiast u dziecka z AML Bu i Cy. W profilaktyce GvHD stosowano CsA oraz MTX. U wszystkich dzieci podano ATG w celu T-deplecji *in vivo*. CLS zdiagnozowano w +2, +11 oraz +11 dobie po HSCT. W leczeniu stosowano metylprednizolon w dawce 2 mg/kg oraz forsowano diurezę. Zaobserwowano ustąpienie objawów CLS po zastosowanym leczeniu u wszystkich trzech pacjentów – Tabela 3.5.6.b.

Tabela 3.5.6.b. CLS w badanej grupie (n=3; 10,3%)

	Pacjent	Rozpoznanie	Faza	Typ dawcy	Kondycjonowanie i T-deplecja	CLS doba po HSCT	Zastosowane leczenie
1	DO	sAML	CR1	MUD	Bu, Cy, Mel, ATG	2	Metyprednizolon
2	IK	AML	CR2	MUD	Bu, Cy, ATG	11	Metyprednizolon
3	ZS	sAML	CR1	MUD	Bu, Cy, Mel, ATG	11	Metyprednizolon

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

AML – ostra białaczka szpikowa,

sAML - wtórna ostra białaczka szpikowa,

Bu – busulfan,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Cy – cyklofosfamid,

Mel – melfalan,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony.

3.6. Zapobieganie, rozpoznawanie, leczenie oraz występowanie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych w badanej grupie

3.6.1. Zapobieganie powikłaniom infekcyjnym po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

Zakażeniom u biorców komórek krwiotwórczych zapobiegano stosując niżej wymienione metody i środki:

1. rozpoznanie źródeł endogennych zakażeń oraz ich leczenie;
2. sanacja uzębienia przed HSCT;
3. profilaktyczne stosowanie trymetoprymu-sulfometoksazolu, antybiotyków przeciwgrzybiczych i acyklowiru lub - w uzasadnionych sytuacjach - gancykloviru;
4. podaż dożylnych preparatów poliwalentnych immunoglobulin w dawkach niezbędnych do utrzymania osoczowego stężenia gammaglobulin na poziomie ≥ 500 mg/dl;
5. środki o działaniu niszczącym bakterie, grzyby i wirusy stosowane miejscowo do pielęgnacji błon śluzowych i powłok skórnych;
6. gotowane posiłki;
7. od dnia ok. -10 do dnia, w którym liczba granulocytów przekroczy wartość $0,5 \times 10^9/l$, lecz nie krócej jak do dnia +25, sterylna bielizna oraz sterylizacja przedmiotów, z którymi kontaktuje się pacjent;

8. od dnia -4 lub -3 do dnia, w którym liczba leukocytów przekroczyła wartość $1,5 \times 10^9/l$, a liczba granulocytów $0,5 \times 10^9/l$, umieszczanie pacjenta w sali z laminarnym przepływem powietrza oczyszczonym przez filtry absolutne;
9. przetaczanie wyłącznie ubogoleukocytarnego (filtrowanego) i napromieniowanego koncentratu krwinek czerwonych i krwinek płytkowych;
10. jeden raz w tygodniu posiewy mikrobiologiczne oraz badania molekularne w kierunku zakażenia CMV, a u pacjentów, u których zastosowano w kondycjonowaniu T-deplecję *in vivo* także w kierunku wirusa Epstein-Barr (*ang. Epstein-Barr virus, EBV*) i adenowirusa (*ang. adenovirus, ADV*).

3.6.2. Rozpoznawanie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

Gorączkę neutropeniczną rozpoznawano, gdy w okresie neutropenii stwierdzano stan podwyższonej ciepłoty ciała $>38^{\circ}\text{C}$ trwający conajmniej 1 godzinę lub stan podwyższonej ciepłoty ciała $>38^{\circ}\text{C}$ obserwowano dwukrotnie, w odstępie 12 godzin lub stwierdzano stan podwyższonej ciepłoty ciała $>38,3^{\circ}\text{C}$ niezależnie od czasu jego trwania.

Gdy czynnik patogenetyczny gorączki trwającej ponad 3 dni nie został ustalony, rozpoznawano FUO.

Posocznicę diagnozowano, gdy: podwyższonej ciepłocie ciała $>38^{\circ}\text{C}$ lub obniżonej ciepłocie ciała $<36^{\circ}\text{C}$, towarzyszyły: tachykardia, tachypnoe lub hypokapnia oraz w badaniu mikrobiologicznym uzyskano dodatnie posiewy krwi. [90].

Wstrząs septyczny rozpoznawano, gdy posocznicy towarzyszyła hipotensja i zaburzenia przepływu tkankowego, pomimo należytego wypełnienia łóżyska

naczyniowego, przy czym utrzymanie należnych wartości ciśnienia tętniczego wymagało stosowania leków inotropowych lub obkurczających naczynia [90].

W celu ustalenia etiologii powikłań infekcyjnych po HSCT przeprowadzano diagnostykę mikrobiologiczną materiału pochodzącego z: krwi i innych płynów ustrojowych, wymazu z górnych dróg oddechowych, płwociny, popłuczyn oskrzelowo-płucnych, płynu mózgowo-rdzeniowego, kału, wymazu z rany, końcówki cewnika centralnego. Procedura diagnostyki mikrobiologicznej u pacjentów w neutropenii, przy podejrzeniu zakażenia krwi, obejmowała pobranie 2 próbek krwi w odstępach 1-godzinnych, z 2 różnych miejsc wkłucia. U pacjentów z założonymi cewnikami centralnymi, u których podejrzewano zakażenie pochodzenia odcewnikowego, obowiązywała zasada jednoczesnego pobrania krwi z cewnika centralnego oraz z wkłucia obwodowego [91-94].

Do identyfikacji zakażeń grzybiczych służyły: hodowla, testy serologiczne (galaktomannan) oraz badania molekularne metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*ang. polymerase chain reaction, PCR*) (Apergillus-PCR, Candida-PCR i inne), które były wykonywane w sytuacjach mogących nasuwać podejrzenie zakażenia grzybiczego [91-94].

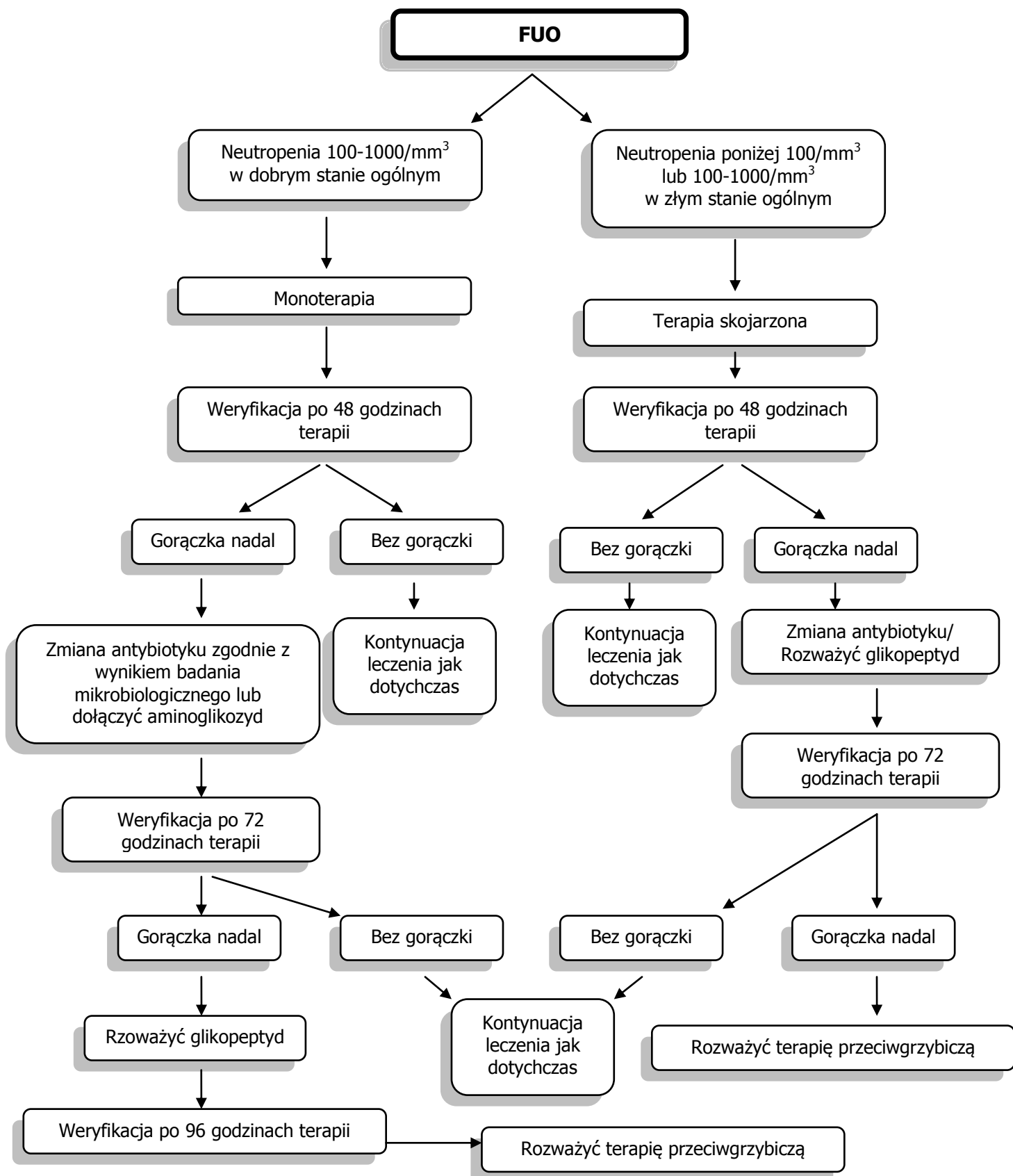
Monitorowanie zakażeń wirusowych wykonywano w oparciu o badanie PCR: jeden raz w tygodniu w kierunku CMV, co dwa tygodnie w kierunku EBV, ADV. U pacjentów, u których zastosowano w kondycjonowaniu T-deplecję *in vivo* monitorowanie reaktywacji zakażenia EBV i ADV odbywało się raz w tygodniu. Diagnostykę reaktywacji zakażenia BKV przeprowadzano w momencie wystąpienia objawów krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego [20, 71, 72].

W diagnostyce powikłań infekcyjnych po HSCT wykorzystywano dodatkowo badania laboratoryjne: CRP (norma CRP <0,5 mg/dl), PCT (PCT poniżej 0,5 u

pacjentów z gorączką neutropeniczną sugerowała, że etiologia gorączki jest nieinfekcyjna lub gorączka wywołana jest infekcją wirusową lub grzybiczą lub jest we wczesnej fazie infekcji bakteryjnej. PCT między 0,5 a 2 wskazywała na infekcję o charakterze lokalnym lub bakterie, powyżej 2,0 na posocznicy lub wstrząs septyczny) oraz badania obrazowe (zdjęcia rentgenowskie, badania ultrasonograficzne, tomografia komputerowa) [74, 75].

3.6.3. Leczenie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

U pacjentów w fazie aplastycznej po allo-HSCT leczenie FUI obejmowało antybiotykoterapię w postaci monoterpii, która zarezerwowana była dla pacjentów w dobrym stanie ogólnym z neutropenią między 100-1000/mm³ oraz w postaci terapii skojarzonej, dla pacjentów z neutropenią poniżej 100/mm³ bez względu na stan ogólny oraz w złym stanie ogólnym z neutropenią między 100-1000/mm³. W monoterpii znajdowały zastosowanie: penicyliny antypseudomonasowe, cefalosporyny III generacji oraz karbapenemy, zaś w terapii skojarzonej: aminoglikozydy w połączeniu z cefalosporyną III generacji lub penicyliną antypseudomonasową lub karbapenemem oraz glikopeptydy tj. wankomycyna, teikoplanina. W przypadku zakażenia bakteriami Gram dodatnimi opornymi na glikopeptydy, alternatywę terapeutyczną stanowił oksazolidynon (linezolid). Zakażenia grzybicze leczono zgodnie z rekomendacjami przedstawionymi przez Marchetti O; et al [95]. Ogólny schemat leczenia pacjentów z FUI przedstawia Ryc. 3.6.3. [94, 96-100].



Ryc. 3.6.3. Ogólny schemat leczenia pacjentów z FUO (rysunek własny w oparciu

o: [94; 96-100])

W leczeniu reaktywacji CMV stosowano gancyklovir w dawce 2 x 5 mg/kg/dobę przez 14 dni. Terapię gancyklovirem kontynuowano przez 7 kolejnych dni, gdy w kontrolnym badaniu CMV-PCR w 12 dobie terapii nie uzyskano negatywizacji antygenów wirusa CMV. Brak negatywizacji antygenów wirusa CMV po 21 dniach terapii gancyklovirem, było wskazaniem do włączenia leczenia foscavirem w dawce 2 x 60 mg/kg/dobę. U pacjentów z chorobą cytomegalowirusową stosowano gancyklovir w dawce 2 x 5 mg/kg/dobę lub foscavir w dawce 3 x 60 mg/kg [20, 71].

Reaktywację EBV leczono rytuksymabem jednorazowo w dawce 375 mg/m². Terapię rytuksymabem kontynuowano w sytuacji braku negatywizacji EBV-DNA w kontrolnym badaniu PCR lub w przypadku wystąpienia potransplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej (*ang. posttransplant lymphoproliferative disorder, PTL*) [20].

Terapia krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego wywołanego reaktywacją zakażenia Adenowirusem i/lub BKV oparta była na jednorazowym podaniu cidofoviru w dawce 5mg/kg. Zwiększano również ilości kroplówek płuczających do 5 litrów/m²/dobę oraz forsowano diurezę lekami moczopędnymi [20].

3.6.4. Występowanie powikłań infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych w badanej grupie

Ogółem we wczesnym okresie potransplantacyjnym obserwowano 26 powikłań infekcyjnych u 23 (79,3%) biorców HSC, z czego 14 (53,8%) stanowiły FUO, 12 (46,2%) posocznice bakteryjne.

FUO wystąpiła u pacjentów u których HSCT wykonano z następujących wskazań: ALL (n=6/12; 50%), AML (n=2/6; 33,3%), sAML (0/2; 0%) BAL (n=0/3; 0%), CML (n=1/1; 100%), SAA (n=2/2; 100%), ALD (n=2/2; 100%), limfohistiocytoza

hemofagocytarna (n=1/1; 100%). FOU obserwowana była u 8 pacjentów po MSD-HSCT oraz 5 po MUD-HSCT, 1 po Haplo-HSCT. Spośród 14 pacjentów z FOU, u 8 przeszczepiono komórki pochodzące ze BM, u 5 przeszczepiono komórki z PB, u 1 z CB. FOU wystąpiła w okresie od 5 do 18 doby po HSCT (mediana 11 dni).

Posocznice obserwowano u biorców HSC z rozpoznaniem: ALL (n=7/12; 58,3%), AML (n=3/6; 50%), sAML (0/2; 0%), BAL (n=1/3; 33,3%), CML (n=0/1; 0%), SAA (n=0/2; 0%), ALD (n=1/2; 50%), limfohistiocytoza hemofagocytarna (n=0/1; 0%). Wśród pacjentów, u których w okresie potransplantacyjnym stwierdzono posocznicę, u 4 pacjentów wykonano MSD-HSCT, u 6 MUD-HSCT, u 2 natomiast Haplo-HSCT. Źródło komórek stanowiła u 7 pacjentów PB, u 5 BM. Posocznica wystąpiła w okresie od 5 do 39 doby po HSCT (mediana 5 dni).

3.7. Rozpoznawanie, leczenie i występowanie MODS w badanej grupie

3.7.1. Kryteria diagnostyczne MODS

MODS jest stanem, w którym u chorego doszło do niewydolności conajmniej dwóch narządów lub układów: centralnego układu nerwowego, układu krążenia, niewydolności oddechowej, niewydolności wątroby lub niewydolności nerek. MODS rozpoznawano, gdy stwierdza się:

- zaburzenie czynności układu krążenia – niedociśnienie (skurczowe ciśnienie tętnicze <90 mmHg lub średnie ciśnienie tętnicze <70 mmHg) utrzymujące się przez więcej niż 1 godzinę mimo odpowiedniego nawodnienia lub konieczność podawania leków obkurczających naczynia krwionośne w celu utrzymania prawidłowego ciśnienia tętniczego,

- zaburzenie czynności układu oddechowego – wskaźnik oksigenacji (PaO₂/FiO₂) poniżej 250 mmHg, a jeżeli występują pierwotne choroby układu oddechowego poniżej 200 mmHg,
- zaburzenie czynności nerek – diureza <0,5 ml/kg/godz. przez 2 godziny przy prawidłowym nawodnieniu lub stężenie kreatyniny w surowicy powyżej 2 razy górna granica normy,
- zaburzenia metaboliczne – kwasica nieoddechowa (stężenie mleczanu powyżej 1,5 raza górna granica normy, pH krwi tętniczej <7,3 lub nadmiar zasad BE ≤5 mmol/l),
- zaburzenia hemostazy – liczba płytek krwi <100 000/μl lub jej zmniejszenie o ≥50% w stosunku do wartości sprzed 3 dni lub o ≥30% w stosunku do wartości sprzed 24 godz. (wskutek DIC),
- zaburzenia czynności wątroby – stężenie bilirubiny w surowicy powyżej 3 razy górna granica normy, żółtaczka, wskaźnik protrombinowy (INR) >3,0,
- zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – objawy uogólnionej encefalopatii (osłupienie, majaczenie, śpiączka) [90].

3.7.2. Leczenie MODS

Leczenie MODS obejmowało przede wszystkim postępowanie przyczynowe, o którym mowa w rozdziałach: 3.5.4.c; 3.5.5.b; 3.5.6.a; 3.6.3. Poza leczeniem przyczynowym obowiązywało postępowanie objawowe, które obejmowało: stabilizację układu krążenia (katecholaminy), stastabilizację oddychania na drodze wentylacji zastępczej (respirator), leczenie nerkozastępcze oraz hemofiltrację, utrzymanie prawidłowej równowagi wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej, stosowanie

preparatów płytek krwi, mrożonego osocza, glikokortykosteroidów oraz dodatkowych składników odżywczych.

3.7.3. Występowanie MODS w badanej grupie

Spośród 29 dzieci, u których wykonano allo-HSCT, MODS obserwowano u 2 (6,9%) pacjentów.

Pacjent 1. Dziewczynka, lat 10 z rozpoznaniem BAL w CR2, u której wykonano MUD-HSCT. Źródłem komórek krwiotwórczych była PB. Dawka przeszczepionych komórek krwiotwórczych CD 34+ wynosiła 7×10^6 /kg masy ciała biorcy. W skład mieloablacyjnej terapii kondycjonującej wchodził: FTBI, VP-16 oraz Cy. W profilaktyce GvHD stosowano CsA, MTX. Do T-deplecji *in vivo* użyto ATG. W okresie potransplantacyjnym (doba +39) rozpoznano MODS wtórny do TAM (rozpoznanie doba+36). Od doby +39 po HSCT pacjentka hospitalizowana w PICU. Leczenie zakończone niepowodzeniem w dobie +78 po HSCT.

Pacjent 2. Chłopiec, lat 14 z rozpoznaniem ALL w pierwszej remisji. Poddany drugiej MUD-HSCT, 8 miesięcy po pierwszej MUD-HSCT. Wskazanie do drugiej allo-HSCT była niedostateczna rekonstrukcja szpiku kostnego po pierwszej allo-HSCT. Źródło komórek do drugiej allo-HSCT stanowił BM. Dawka przeszczepionych komórek krwiotwórczych CD 34+ wynosiła $1,5 \times 10^6$ /kg masy ciała biorcy. Przygotowywany do drugiej allo-HSCT za pomocą Flu oraz ATG. W profilaktyce GvHD stosowano CsA, MTX. W dobie +50 obserwowano cechy MODS wtórne do powikłań infekcyjnych (dodatni posiew krwi: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* oraz cechy śródmiąższowego zapalenia płuc). Zgon w PICU w dobie +82 po HSCT.

Szczegółowe dane pacjentów z MODS przedstawiono w Tabeli 3.7.3.

Tabela 3.7.3. MODS w badanej grupie (n=2; 6,9%)

	Pacjent	Rozpoznanie	Faza	Typ dawcy	Kondycjonowanie i T-deplecja	MODS doba po HSCT	Przyczyna MODS
1	DG	BAL	CR2	MUD	FTBI, VP-16, Cy, ATG	39	TAM
2	JP	ALL	CR1	MUD	Flu, ATG	50	Posocznica

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

BAL - ostra białaczka bifenotypowa,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Cy – cyklofosfamid,

Flu – fludarabina,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

VP-16 – etopozyd.

3.8. Postępowanie wspomagające

3.8.1. Cewnik centralny

Centralny cewnik żylny, najczęściej dwu- lub trójświatłowy typu Seldingera instalowano w znieczuleniu ogólnym na kilka dni przed rozpoczęciem kondycjonowania do allo-HSCT.

3.8.2. Żywienie doustne i dożylne

W dniu rozpoczęcia kondycjonowania wprowadzano dietę gotowaną, bezmleczną i bezglutenową.

Z chwilą utraty łaknienia i wystąpienia objawów toksycznego uszkodzenia śluzówki przewodu pokarmowego rozpoczynano żywienie pozajelitowe, które kontynuowano do czasu ustąpienia objawów uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz poprawy łaknienia.

Kontrola stanu odżywienia biorców szpiku odbywała się na podstawie codziennej kontroli masy ciała, conajmniej dwa razy w tygodniu oznaczeniu stężenia glukozy, bilirubiny, mocznika, kreatyniny i aktywności aminotransferaz w surowicy oraz conajmniej jeden raz w tygodniu stężenia białka i albumin w surowicy.

3.8.3. Stosowanie preparatów krwiopochodnych

Przetaczano preparaty krwiopochodne, ubogoleukocytarne i naświetlone promieniami gamma do dawki 26 Gy z następujących wskazań: koncentrat krwinek czerwonych, gdy stężenie hemoglobiny wynosiło poniżej 80 g/l, natomiast koncentrat krwinek płytkowych, gdy ich liczba obniżyła się do poniżej $20 \times 10^9/l$ lub występowały objawy skazy krwotocznej.

3.8.4. Zwalczanie bólu

Dolegliwości bólowe łagodzone stosując nienarkotyczne i/lub narkotyczne leki przeciwbólowe.

3.9. Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną (n=6) stanowili pacjenci, u których nie stwierdzono klinicznie jawnych wczesnych powikłań allo-HSCT, zarówno związanych z uszkodzeniem śródbłonnków, jak i mogących prowadzić do ich uszkodzenia, w tym toksyczności narządowej i/lub powikłań infekcyjnych oraz aGvHD II^o-IV^o (Tabela 3.8). W grupie kontrolnej były 4 (66,7%) dziewczynki oraz 2 (33,3%) chłopców w wieku od 4,1 lat do 13,8 lat (mediana 8,5 lat), u których wykonano MSD-HSCT (n=2; 33,3%) oraz MUD-HSCT (n=4; 66,7%), z powodu SAA (n=3; 50%), ALL (n=1; 16,7%), AML (n=1; 16,7%), CML (n=1; 16,7%). Źródłem komórek u 4 (66,7%) dzieci był BM, u 2 (33,3%) dzieci PBSC. Kondycjonowanie u dzieci z grupy kontrolnej było prowadzone wyłącznie w oparciu o przygotowanie chemiczne. U żadnego dziecka nie zastosowano FTBI.

Tabela 3.9. Charakterystyka grupy kontrolnej (n=6)

	Pacjent	Rozpoznanie	Faza	Typ dawcy	Źródło komórek	Kondycjonowanie	T-deplecja
1	GG	ALL	CR2	MUD	PBSC	Flu, Trs, TT	ATG
2	MS	AML	CR1	MSD	SZPIK	Bu, Cy	-
3	JH	CML	CR1	MSD	SZPIK	Bu, Cy	-
4	JN	SAA	-	MUD	SZPIK	Flu, Cy	ATG
5	PB	SAA	-	MUD	PBSC	Flu, Cy	ATG
6	KBG	SAA	-	MUD	SZPIK	Flu, Cy	ATG

ALL – ostra białaczka limfoblastyczna,

AML - ostra białaczka szpikowa,

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

Bu – busulfan,

CR1 – pierwsza remisja,

CR2 – druga remisja,

Cy – cyklofosfamid,

Flu – fludarabina,

MSD – w pełni zgodny dawca rodzinny,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

PBSC – komórki macierzyste pochodzące z krwi obwodowej,

Trs - treosulfan,

TT- tiotepa.

3.10. Metody badań układu białka C

Badanie aktywności PC, stężeń wolnego PS, stężeń sTM, APCr oraz mutacji genu czynnika V Leiden wykonano w Pracowni Hemostazy, Oddziału Hematologii, Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. J. Strusia w Poznaniu.

Próbki krwi pobierano z kontaktu centralnego (5 ml). Do oznaczenia aktywności PC, stężenia wolnego PS i stężenia sTM próbki krwi pobierano w następujących punktach czasowych:

1. przed rozpoczęciem kondycjonowania (przed allo-HSCT),
2. w dniu transplantacji komórek krwiotwórczych, przed przeszczepieniem (doba 0),
3. w 5 dniu po allo- HSCT (doba +5),
4. w 11 dniu po allo- HSCT (doba +11),
5. w 18 dniu po allo- HSCT (doba +18),
6. w 25 dniu po allo- HSCT (doba +25),
7. w 39 dniu po allo- HSCT (doba +39),
8. w 53 dniu po allo- HSCT (doba +53). Próbka w dobie +53 pobierana była tylko u pacjentów, którzy przebywali w Oddziale Transplantacji Szpiku.

Dodatkowo próbki krwi pobierano w pierwszym dniu stwierdzonych powikłań przed wdrożeniem leczenia (powikłania infekcyjne, VOD, TAM, CLS, MODS) oraz w momencie poprawy lub pogorszenia się stanu ogólnego pacjenta.

Do oznaczenia APCr krew pobierano przed rozpoczęciem kondycjonowania. U pacjentów, u których stwierdzono APCr ≤ 2 wykonywano badanie PCR w kierunku mutacji genu czynnika V (Leiden).

Krew pobierano razem z innymi badaniami, z wkłucia centralnego, standardowo zakładanego podczas przygotowania do zabiegu transplantacji, co nie narażało dziecka na dodatkowe stres czy ból. Próbki krwi pobierano do monowet zawierających cytrynian sodu (3,8% cytrynian w stosunku objętościowym 1:10), a następnie odwirowywano przez 5 min; 3600 obrotów/min. i magazynowano w temperaturze -70°C .

3.10.1. Metoda oznaczania aktywności białka C

Oznaczano PC w oparciu o metodę chromogenną. W metodzie chromogennej PC w osoczu jest aktywowane przez jad węża *Agkistrodon contortrix* zawarty w aktywatorze. Poziom APC jest determinowany przez jego hydrolizę za pomocą zastosowanego substratu chromogenego. Wydzielona p-nitroanilina jest mierzona przy długości fali 405 nm i jest proporcjonalna do poziomu PC.

Przygotowanie odczynników wykonywano w następujący sposób:

1. Protein C Diluent- gotowy do użycia po wstępnym ogrzaniu do temperatury pokojowej,
2. Protein C Substrate- rekonstruowany w 2 ml Protein C Diluent, mieszany przez delikatne odwracanie fiolki i doprowadzony do temperatury pokojowej,
3. Protein C Activator- rekonstruowany w 2 ml wody destylowanej, mieszany przez delikatne odwracanie fiolki i doprowadzony do temperatury pokojowej.

Przygotowano krzywą standardową, próbki kontrolne i badane poprzez rozcieńczenie w 0,85% soli fizjologicznej wg następującego schematu:

Krzywa standardowa %	Osocze standardowe	Diluent
100%	100 μ l	300 μ l
50%	50 μ l	350 μ l
0%	-	400 μ l
próba kontrolna, badana	100 μ l	300 μ l

Do próbek plastikowych umieszczonych w bloku grzejmym o temperaturze 37°C dodano w równych 15– sekundowych odstępach czasu kolejno: po 50 μ l krzywej standardowej, próbek kontrolnych i próbek badanych, inkubowano przez 2 minuty, po 100 μ l aktywatora, inkubowano przez 5 minut, po 100 μ l substratu, inkubowano przez 10 minut, po 100 μ l kwasu octowego 20%. Plastikowe próbki wyciągano z bloku grzejmego i mieszano na Vorteksie. Po przeniesieniu po 200 μ l każdej próbki do dołków na płytce do odczytu, odczytywano absorbancję przy długości fali 405 nm. Otrzymane wartości absorbancji wprowadzano do programu do obliczeń statystycznych i na ich podstawie określano wartości PC w próbach kontrolnych i badanych wobec krzywej standardowej. Dla każdej serii odczynników, co 8 godzin wykonywano oznaczenie kontroli normalnej i patologicznej w celu oceny prawidłowości wykonania testu. Stosuje się w tym celu tą samą procedurę. Wynik wyrażano w procentach jako aktywność PC. Wartości referencyjne aktywności PC wynoszą: 70%-140%.

3.10.2. Metoda oznaczania stężenia wolnego białka S

Do oznaczania stężenia wolnego PS posłużył kanapkowy test ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) firmy Helena Bioscience. Studzienki badawcze opłaszczone są swoistymi przeciwciałami przechwytyjącymi dla ludzkiego PS. Rozcieńczone osocze pacjenta inkubowane w studzienkach, pozwala na związanie całego wolnego PS z monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko ludzkiemu PS na

powierzchni studzienek. Studzienki są płukane celem usunięcia wszelkich niezwiązanych cząsteczek osocza. Związane wolne PS jest oznaczane ilościowo przy użyciu peroksydazy chrzanowej sprzężonej z poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko ludzkiemu PS. Po inkubacji, niezwiązany koniugat podczas płukania jest usuwany. Następnie w celu wywołania reakcji barwnej, dodawany jest chromogeny substrat (tetrametylobenzydyna) i nadtlenuk wodoru. Intensywność powstałej barwy mierzona jest w jednostkach gęstości optycznej na spektrofotometrze przy 450 nm. Stężenie procentowe antygeny wolnego PS w osoczu pacjenta oznaczane jest względem krzywej przygotowanej przy pomocy osocza referencyjnego.

Przygotowano odczynniki według schematu:

1. Mikrostudzienki zawierające antygen wolnego PS – gotowe do użycia,
2. Rozcieńczalnik próbek (Sample Diluent) – gotowy do użycia,
3. Osocze referencyjne ELISA – rozpuszczone w 0,5 ml dejonizowanej wody, wymieszane, odstawione na 10 minut przed użyciem do całkowitego rozpuszczenia,
4. Roztwór koniugatu PS – gotowy do użycia,
5. Substrat – gotowy do użycia,
6. Roztwór wstrzymujący reakcję – gotowy do użycia,
7. Stężona sól fizjologiczna buforowana fosforanem (wash solution) – 30 ml stężonej soli rozcieńczono do 1 litra dejonizowaną wodą, pH końcowe roztworu wynosiło 7.35 ± 0.1 .

Procedura wykonania testu:

Przygotowano krzywą standardową, próbki kontrolne i badane poprzez rozcieńczenie:

Krzywa standardowa %	Osocze standardowe	Diluent
150%	0,03 ml	0,5 ml
100%	0,02 ml	0,5 ml
75%	0,25 ml 150%	0,25 ml
50%	0,25 ml 100%	0,25 ml
25%	0,25 ml 50%	0,25 ml
12,5%	0,25 ml 25%	0,25 ml
Próba kontrolna, badana	0,02 ml	0,5 ml

Dodano po 0,1 ml krzywej standardowej, rozcieńczonych próbek kontrolnych i próbek badanych do dołków, a następnie inkubowano przez 40 minut w temperaturze pokojowej. Jako reagent blank well dodano Sample Diluent, natomiast water blank well pozostawiono pusty do końca testu. Po inkubacji wylano zawartość studzienek i płukano 4 razy dodając za każdym razem do każdego dołka po 0,2 ml wash solution. Dodano po 0,1 ml koniugatu i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji wylano zawartość studzienek i płukano 4 razy dodając za każdym razem do każdego dołka po 0,2 ml wash solution. Dodano po 0,1 ml substratu i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, obserwując reakcję zmiany koloru. Dodano po 0,1 ml roztworu stopującego reakcję. Do water blank well dodano po 0,2 ml wody destylowanej. Odczytano absorbancję przy długości fali 450 nm w ciągu 30 minut.

Dla każdej serii odczynników, co 8 godzin wykonano oznaczenie kontroli normalnej i patologicznej w celu oceny prawidłowości wykonania testu. Stosowano w tym celu tą samą procedurę. Wynik wyrażano w procentach jako stężenie wolnego PS. Wartości referencyjne stężenia wolnego PS wynoszą powyżej 50%.

3.10.3. Metoda oznaczania stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny

Stężenie sTM oznaczano kanapkowym testem ELISA firmy American Diagnostica, który wykorzystuje monoklonalne przeciwciała rozpoznające naskórkowe czynniki wzrostu (*ang. epidermal growth factor 1 and 2, EGF₁, EGF₂*) - domeny TM. Rozcieńczone osocze pacjenta inkubowane jest w studzienkach, pozwalając na związanie TM z monoklonalnymi przeciwciałami, którymi są opłaszczzone studzienki badawcze. Studzienki są płukane celem usunięcia wszelkich niezwiązanych cząsteczek osocza. Związana TM jest oznaczana ilościowo przy użyciu peroksydazy chrzanowej sprzężonej z poliklonalnymi przeciwciałami przeciwko TM. Po inkubacji, niezwiązany koniugat zostaje usunięty. Następnie w celu wywołania reakcji barwnej, dodawany jest chromogenny substrat (tetrametylobenzydyna) i nadtlenek wodoru. Intensywność powstałej barwy mierzona jest w jednostkach gęstości optycznej na spektrofotometrze przy 450 nm.

Przygotowanie odczynników odbyło się według schematu:

1. Mikrostudzienki opłaszczone przeciwciałami – gotowe do użycia.
2. Rozcieńczalnik koniugatu (Detection Antibody Diluent) – rozpuszczono w 15 ml wody dejonizowanej i wymieszano, następnie 15 ml powstałego rozcieńczenia dodano do kolejnych 15 ml wody dejonizowanej i ponownie wymieszano.
3. Rozcieńczalnik do osocza standardowego (Thrombomodulin Depleted Plasma) – rozpuszczono w 0,5 ml zimnej (2-8°C) wody destylowanej i pozostawiono na 2-3 minuty na lodzie. Wymieszano.
4. Osocze standardowe – przygotowano 5% roztwór rozcieńczalnika substratu i pozostawiono na 5 minut, następnie dodano 1 ml 5% roztworu do standardu.

5. Osocze kontrolne – rozpuszczono w 0,5 ml zimnej wody destylowanej i mieszano przez 2 minuty.
6. Roztwór koniugatu – rozcieńczono potrzebną ilość dodając 10µl na każdy 1 ml Detection Antibody Diluent.
7. Substrat – gotowy do użycia.
8. Stężona sól fizjologiczna buforowana fosforanem (Wash Buffer) – rozpuszczono w 900 ml wody destylowanej, mieszano, a następnie uzupełniano wodą destylowaną do 1 l.
9. Rozcieńczalnik próbek (Sample Buffer) – przygotowano potrzebną ilość dodając albuminy do wash buffer w celu otrzymania roztworu 1 %.

Przygotowano krzywą standardową wg następującego schematu:

Krzywa standardowa ng/ml	Osocze standardowe ml	TM Depleted Plasma ml
10	-	-
5	0,5 z 10ng/ml	0,5
2,5	0,5 z 5 ng/ml	0,5
1,25	0,5 z 2,5 ng/ml	0,5
0,625	0,5 z 1,25 ng/ml	0,5
0	-	0,5

Rozcieńczono próbki badane i kontrolne w stosunku 1:4 w Sample Buffer.

Dodano po 200 µl rozcieńczonych próbek do dołków i inkubowano 60 minut w temperaturze pokojowej. Do reagent blank well dodano Sample Buffer. Po inkubacji wylewano zawartość studzienek i płukano 4 razy dodając za każdym razem po 200 µl wash buffer. Dodano po 200 µl koniugatu i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji wylewano zawartość studzienek i płukano 4 razy dodając za każdym razem po 200 µl wash solution. Dodano po 200 µl substratu i inkubowano 20

minut w temperaturze pokojowej obserwując reakcję zmiany barwy. Dodano po 100 μ l 0,5 M kwasu siarkowego, wstrzymującego reakcję. Odczytano absorbancję przy długości fali 450 nm w ciągu 30 minut

Dla każdej serii odczynników co 8 godzin wykonano oznaczenie osocza kontrolnego znajdującego się w zestawie. Wynik wyrażamy w ng/ml jako stężenie sTM (wartości referencyjne 2,73-4,79 ng/ml).

3.10.4. Metoda oznaczania oporności na aktywowane białko C

Oznaczenie APCr wykonywano testem krzepięciowym Proc® Ac R firmy Dade Behring. Test bazuje na aktywacji endogennego PC przez inkubację osocza badanego z aktywatorem. U zdrowych osób aktywacja PC skutkuje dwu- lub trzykrotnym wydłużeniem czasu krzepnięcia w porównaniu do czasu krzepnięcia osocza bez aktywatora. U osób z mutacją w genie czynnika V aktywacja PC skutkuje tylko niewielkim (mniej niż 1,5 raza) wydłużeniem czasu krzepnięcia. Wynik wyraża się jako stosunek czasu krzepnięcia osocza badanego z aktywatorem do czasu krzepnięcia osocza badanego bez aktywatora.

Przygotowano odczynniki według schematu:

1. Activator Reagent- rekonstruowano liofilizowany odczynnik w 2 ml wody destylowanej, mieszano przez delikatne odwracanie fiolki.
2. PR3V Reagent - rekonstruowano liofilizowany odczynnik w 4 ml wody destylowanej, mieszano przez delikatne odwracanie fiolki.

Oznaczenie przeprowadzono w koagulometrze półautomatycznym BFTII. Odczynnik PR3V Reagent inkubowano przez cały czas wykonywania testu w komorze umieszczonej w aparacie i nastawionej na temperaturę 37° C. Do kuwetki pomiarowej z

magnezem również umieszczonej w aparacie dodano osocza badanego przeznaczając 50 µl na test. Następnie dodano aktywatora w ilości 50 µl i przeprowadzono inkubację przez 5 minut w temperaturze 37° C. Po inkubacji przeniesiono kuwetę do komory pomiarowej i dodano PR3V Reagent w ilości 50 µl. Aparat dokonuje pomiar czasu krzepnięcia mieszaniny i zatrzymuje się automatycznie w momencie wytworzenia się skrzepu. Jest to oparte na metodzie nefelometrycznej. W podobny sposób wykonano oznaczenie osocza badanego bez aktywatora. W jego miejsce dodano buforu weronalowego lub soli fizjologicznej w ilości 50 µl. Wykonano 2 pomiary dla każdego pacjenta.

Dla każdej serii odczynników co 8 godzin wykonano oznaczenie kontroli normalnej i patologicznej w celu oceny prawidłowości wykonania testu. Stosowano w tym celu tą samą procedurę.

APCr stanowi czas krzepnięcia osocza badanego z aktywatorem do czasu krzepnięcia osocza badanego bez aktywatora. Wartości referencyjne APCr wynoszą 2,0-4,0. Test APCr jest testem przesiewowym. W pacjentów ze stwierdzoną APCr zostało wykonane badanie PCR w kierunku mutacji genu czynnika V Leiden.

3.11. Metody oznaczania mutacji genu czynnika V

Mutację Leiden G1691A genu czynnika V wykrywa się metodą RFLP (*ang. restriction fragments length polymorphism*), tj. analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. DNA izolowane jest z krwi pełnej pobranej na wersenian sodu, metodą kolumnkową, według instrukcji producenta zestawu (QIAamp® DNA Blood Mini Kit). DNA po izolacji z krwi namnażano z użyciem specyficznych starterów w reakcji PCR. Reakcja PCR była przeprowadzana z użyciem specyficznych starterów:

5'CATGAGAGACATCGCCTCTG3' i 5'GACCTAACATGGTTCTAGCCAGAAG3',
w mieszaninie reakcyjnej zawierającej dNTP, bufor, polimerazę Taq oraz DNA pacjenta.
Reakcja zachodziła w termocyklerze, przy następującym profilu termicznym:

PCR FVL			
95°	2 minuty	Denaturacja	32x
95°	20 sekund	Denaturacja	
60°	30 sekund	Przyłączanie starterów	
72°	30 sekund	Elongacja	
72°	7 minut	Etap końcowy	

Uzyskany produkt był trawiony enzymem restrykcyjnym *MnII* z użyciem buforu G (w zestawie z enzymem), w 37°C, przez 1h. Mutacja Leiden powoduje zamianę guaniny na adeninę w pozycji 1691 łańcucha DNA. Zmiana ta usuwa miejsce restrykcyjne dla enzymu *MnII*, co identyfikowano rozdzielając produkt restrykcji na żelu agarozowym. Elektroforeza była przeprowadzana w 2% żelu agazozowym, z dodatkiem bromku etydyny, w 0,5x buforze TBE.

3.12. Charakterystyka i zasady kwalifikacji dawców szpiku

W przypadku MSD-HSCT oznaczenia antygenów zgodności tkankowej (*ang. human leukocyte antigens, HLA*) u biorcy i jego rodzeństwa oraz u rodziców prowadzono metodą serologiczną w zakresie A, B, Cw, a następnie zgodność potwierdzano metodą genetyczną na poziomie wysokiej rozdzielczości, tj. na poziomie allelicznym w zakresie 5 *loci* HLA-A, -B, Cw, DRB1 i DQB1. W przypadku dawcy rodzinnego dopuszcza się ocenę HLA niskiej rozdzielczości, o ile zbadano dostępnych rodziców i dokonano segregacji haplotypów. Dobór dawcy w przypadku MUD-HSCT wykonywano zawsze metodą genetyczną na poziomie wysokiej rozdzielczości.

Oznaczenia wykonywano w pracowni akredytowanej przez EFI (Instytut Hematologii w Warszawie).

Wyboru dawcy dokonywano w następującej kolejności:

1. W przypadku większości chorób identyczny bliźniak był najlepszym wyborem. Ze względu na redukcję reakcji GvL (*ang. graft versus leukemia reaction, GvLR*), w części przypadków (np. wznowa ostrej białaczki), gdzie pożądany jest GvLR, preferowany był dawca alternatywny,
2. rodzeństwo całkowicie zgodne w HLA,
3. dawca rodzinny z jedną niezgodnością w HLA,
4. zgodny dawca niespokrewniony (HLA-A, B, C, DRB1 i DQB1). Jeśli nie był dostępny, preferowani byli kolejno następujący dawcy: z jedną niezgodnością w HLA-DQB1, z jedną niezgodnością w HLA-C, z dwiema lub więcej niezgodnościami w HLA-DQB1 i HLA-C, z jedną niezgodnością w HLA-DRB1, z jedną niezgodnością w HLA-A lub HLA-B, dawca z dwiema lub więcej niezgodnościami w HLA-A, HLA-B i HLA-DRB1 nie był zasadniczo akceptowalny.
5. dawcy haploidentyczni byli akceptowani dla biorców z białaczką wysokiego ryzyka, w przypadku braku alternatywnego dawcy. Dawcy haploidentyczni byli dobierani według niezgodności ligandów KIR.

Dla pacjenta CMV-ujemnego dobierano dawcę CMV-ujemnego. W przypadku biorcy CMV-dodatniego i dawcy CMV-dodatniego lub biorcy CMV-dodatniego dawcy CMV-ujemnego lub biorcy CMV-ujemnego i dawcy CMV-dodatniego, dawca był akceptowalny, po przeprowadzeniu profilaktyki anty-CMV po przeszczepieniu.

Zasadniczo preferowano dawcę płci męskiej. W przypadku dawcy niespokrewnionego unikano w miarę możliwości dawcy płci żeńskiej ze względu na

wyższe ryzyko wystąpienia GvHD. Dla biorcy płci żeńskiej również preferowano dawcę płci męskiej.

Wyłącznie dawcy, u których w przeprowadzonych badaniach przeprowadzonych zgodnie z protokołem badań dawcy nie stwierdzono żadnych odchyłeń od stanu prawidłowego, byli kwalifikowani do pobrania HSC. Pobranie szpiku od nieletniego rodzeństwa – zgodnie z Ustawą o pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów - wykonywano po uzyskaniu zgody opiekunów prawnych dawcy oraz zgody Sądu Rodzinnego właściwego ze względu na miejsce zamieszkania.

3.13. Zgoda na przeprowadzenie badań

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 1198/08).

Zarówno rodzice, opiekuni prawni dziecka oraz pacjent zostali poinformowani o stanie wiedzy oraz naturze, celach i czasie trwania przedstawionego badania, a także o korzyściach i możliwym ryzyku związanym z wzięciem udziału w badaniu. Rodzice, opiekuni prawni dziecka oraz pacjenci powyżej 16 roku życia otrzymali do podpisania formularz zgody na uczestnictwo w badaniu.

3.14. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programów STATISTICA 9.0. Badanie normalności rozkładu wykonano testem Shapiro-Wilka. Dla zmiennych niepowiązanych w skali nominalnej użyto testu Chi–kwadrat i dokładnego testu Fishera, natomiast dla zmiennych niepowiązanych, w skali interwałowej analizy

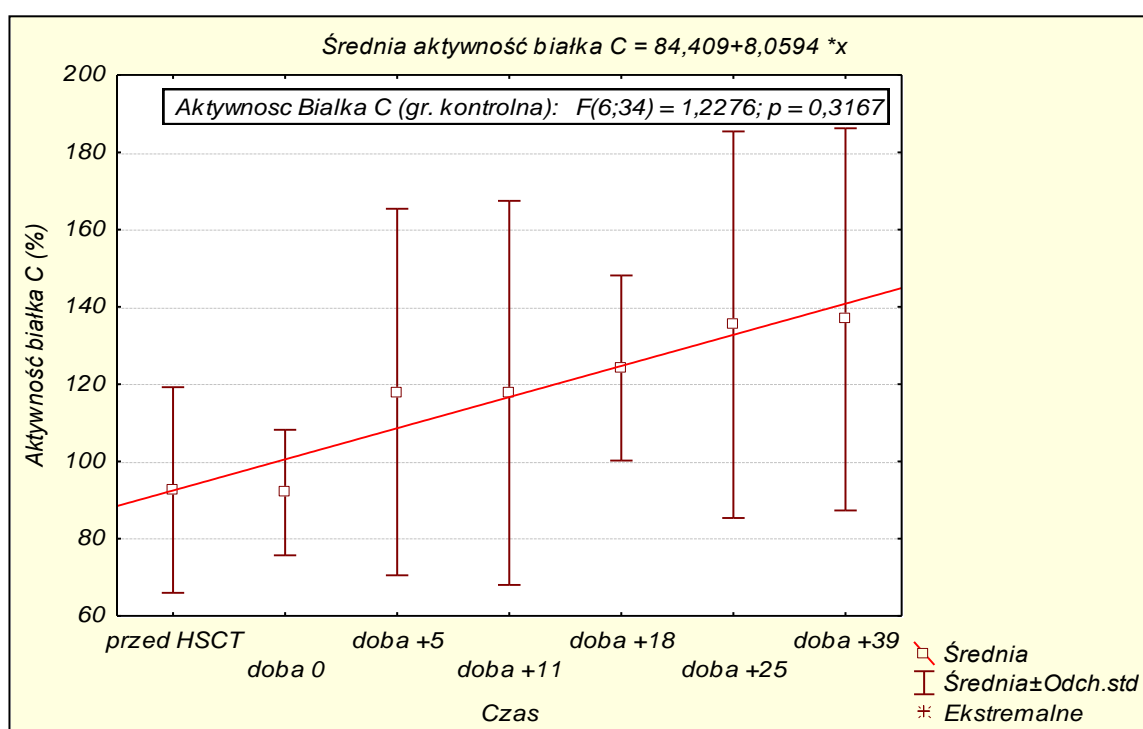
wariancji (przy zachowanej normalności rozkładu) i test Kruskala– Wallisa (przy braku normalności rozkładu). Homogeniczność wariancji sprawdzono przy użyciu testów: Levene'a, Borna-Forsythe'a i Cochran-Bartlett-Hartleya. Dla sytuacji, gdy zostały spełnione założenia homogeniczności wariancji dla oceny różnic między zmiennymi użyto wieloczynnikowej ANOVY z odpowiednimi testami post-hoc, natomiast w przypadku braku ich spełnienia wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Do oceny korelacji użyto testu Tau-Kendalla. Za znamienne statystycznie uznano różnice, dla których wartość p obliczona w odpowiednich testach, była mniejsza od 0,05.

4. WYNIKI

4.1. Białko C

4.1.1. Aktywność białka C w osoczu w grupie kontrolnej

Analiza aktywności PC w grupie kontrolnej (n=6) nie wykazała znamiennej różnicy statystycznej aktywności PC między punktem czasowym przed rozpoczęciem kondycjonowania a kolejnymi punktami czasowymi. W grupie kontrolnej średnia aktywność PC w poszczególnych punktach czasowych pozostawała w granicach wartości referencyjnych, tj. w przedziale od 70% do 140% (Ryc. 4.1.1. oraz Tabela 4.1.1.).



Ryc. 4.1.1. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

Tabela. 4.1.1. Porównanie aktywności białka C przed rozpoczęciem kondycjonowania z aktywnościami białka C w innych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

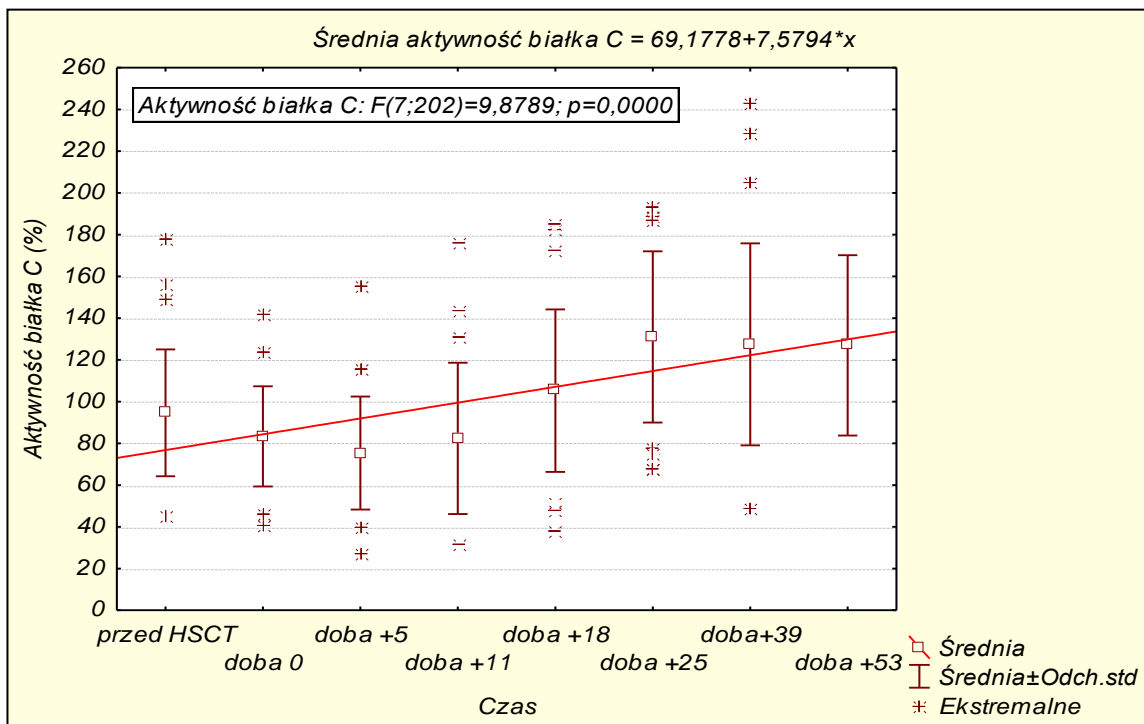
	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnia aktywność białka C (%) ± SD	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.1.2. Aktywność białka C w osoczu w grupie badanej

Oznaczenie aktywności PC wykonano wśród 29 biorców HSCT. Średnia aktywność białka C przed rozpoczęciem terapii kondycjonującej była w granicach normy. Obserwowano obniżenie aktywności PC w dobach: 0, +5, +11 w stosunku do okresu przed rozpoczęciem kondycjonowania, bez znamienności statystycznej. Aktywność PC była znamienne wyższa w dobie +25 w porównaniu do punktu czasowego: przed HSCT ($p=0,05$). Aktywność PC osiągnęła minimum w dobie +5, a maksimum w dobie +25. Wykazano następujące znamienne różnice statystyczne aktywności PC: doba 0 vs +25, 0 vs +39, +5 vs +25, +5 vs +39, +11 vs +25, +11 vs +39 ($p<0,001$) (Ryc. 4.1.2.a. i Tabela 4.1.2.a.).



Ryc. 4.1.2.a. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie badanej (n=29)

Tabela. 4.1.2.a. Porównanie aktywności białka C przed rozpoczęciem kondycjonowania z aktywnościami białka C w innych punktach czasowych w grupie badanej (n=29)

	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnia aktywność białka C (%) ± SD	94,6 ± 30,4	83,3 ± 24	75,3 ± 27,1	82,4 ± 36,3	105,2 ± 38,9	131 ± 41	127,4 ± 48,4	126,9 ± 43,2
p		NS	NS	NS	NS	0,05	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

W Tabeli 4.1.2.b. przedstawiono wyniki analizy aktywności PC w zależności od następujących zmiennych: typu choroby podstawowej (rozrostowa vs. nierozrostowa), typu dawcy HSC, zastosowanego kondycjonowania, zastosowania ATG w kondycjonowaniu, źródła komórek HSC, liczby przeszczepionych komórek CD34+. Uzyskano następujące wyniki:

- średnia aktywność PC u biorców z rozpoznaniem choroby rozrostowej była istotnie niższa w dobach: +5, +11 i +18 po HSCT w stosunku do pacjentów z rozpoznaniem choroby nierozrostowej, jednak średnia aktywność PC pozostawała w granicach wartości referencyjnych w obu grupach;

- aktywność PC u biorców HSC kondycjonowanych przy użyciu FTBI w dobie +5 była znamienne niższa w stosunku do aktywności PC u dzieci po terapii Bu,

- u dzieci, u których przeszczepiono $\geq 3 \times 10^6$ /kg masy ciała biorcy komórek CD34+ aktywność PC w dobie +5 była niższa w porównaniu z dziećmi, u których podano $< 3 \times 10^6$ /kg masy ciała biorcy CD34+,

- aktywność PC u pacjentów ATG+PBSC (n=10) była istotnie niższa w dobie +5 oraz +11 po allo-HSCT aniżeli u pacjentów z grupy ATG+BM (n=4) (ryc. 4.1.2.b.).

- nie wykazano istotnych różnic statystycznych aktywności PC w poszczególnych punktach czasowych wśród biorców BM od MSD (n=13) w porównaniu z biorcami BM od MUD (n=2).

Tabela 4.1.2.b. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w zależności od analizowanych zmiennych

ANALIZOWANE ZMIENNE	ŚREDNIA AKTYWNOŚĆ BIAŁKA C (%)							
	PRZED HSCT	DOBA 0	DOBA +5	DOBA +11	DOBA +18	DOBA +25	DOBA +39	DOBA +53
CHOROBY ROZROSTOWE n=25	93,2	79,5	72	78,5	106,5	129,6	131,8	132,1
CHOROBY NIEROZROSTWE n=4	97,8	102,8	118,5	122,2	115,3	138,8	117,5	120,1
P	NS	0,032	0,003	0,006	NS	NS	NS	NS
MSD n=13	88	82,3	72,4	79,1	112,3	136,7	135,1	147,5
MUD n=14	99,2	86,8	91,7	95,9	105,5	128,1	131,2	146
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FTBI n=9	86,1	75,7	60,3	75,4	96,2	123,3	138,6	137,9
BU n=12	99,1	85,3	83,8	81,3	114,1	134,6	125,7	133,4
P	NS	NS	0,016	NS	NS	NS	NS	NS
TRS n=5	92,1	92,4	79,6	86,6	102,6	120,5	126,6	70
BU n=12	99,1	85,3	83,8	81,3	114,1	134,6	125,7	133,4
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ATG (+) n=14	92,6	78	88,5	93,9	104,6	127,9	130,2	139,8
ATG (-) n=15	96,3	92,8	75,7	82	113,2	136,2	127,3	117,3
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BM n=15	89,4	82,9	80,5	88,6	112	141,6	132,9	147,5
PBSC n=13	99,8	85,5	80,5	85,6	103	117,2	120	111,5
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CD 34+ <3 x 10⁶/kg n=7	97,2	90,9	104,9	101,4	113,7	144	134,1	141,8
CD 34+ ≥3 x 10⁶/kg n=21	93,1	82,3	73,7	83,2	106,4	126,8	126,6	121
P	NS	NS	0,037	NS	NS	NS	NS	NS

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

BU – busulfan,

BM- szpik kostny,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

HSCT-transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

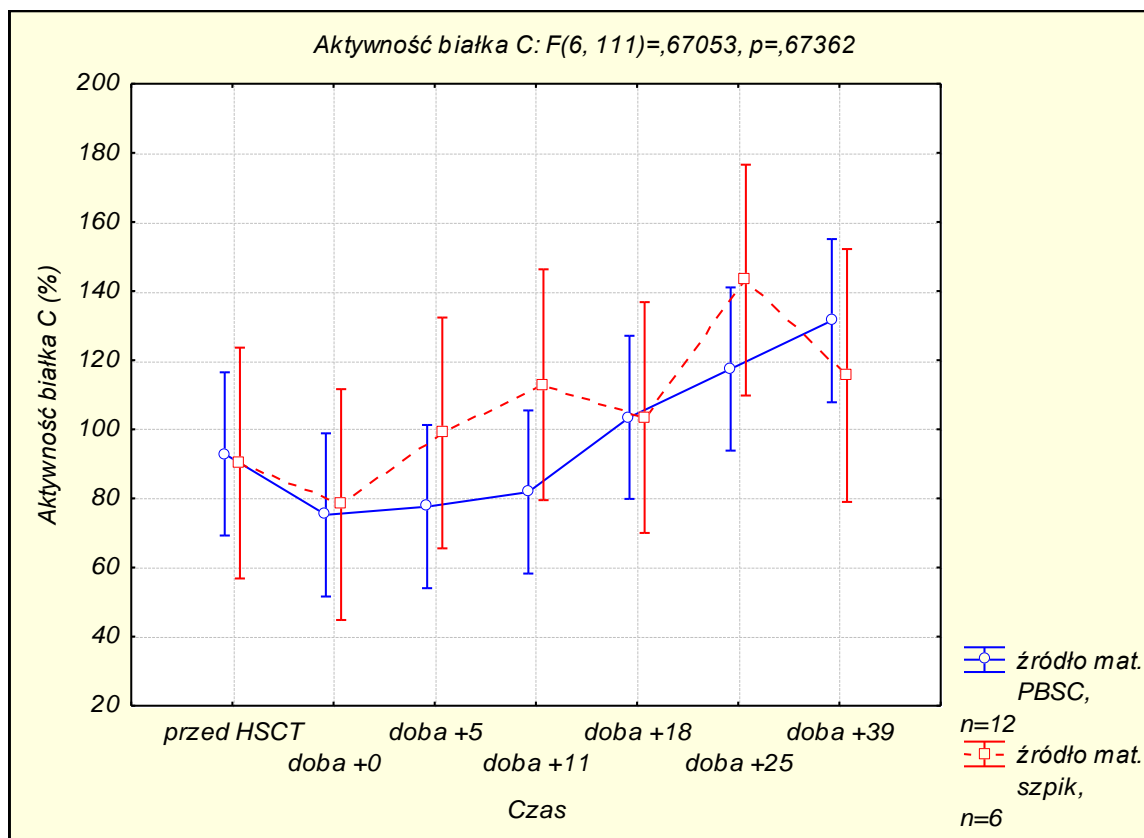
MSD - w pełni zgodny dawca rodzinny,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

NS – brak znamienności statystycznej,

PBSC - komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej,

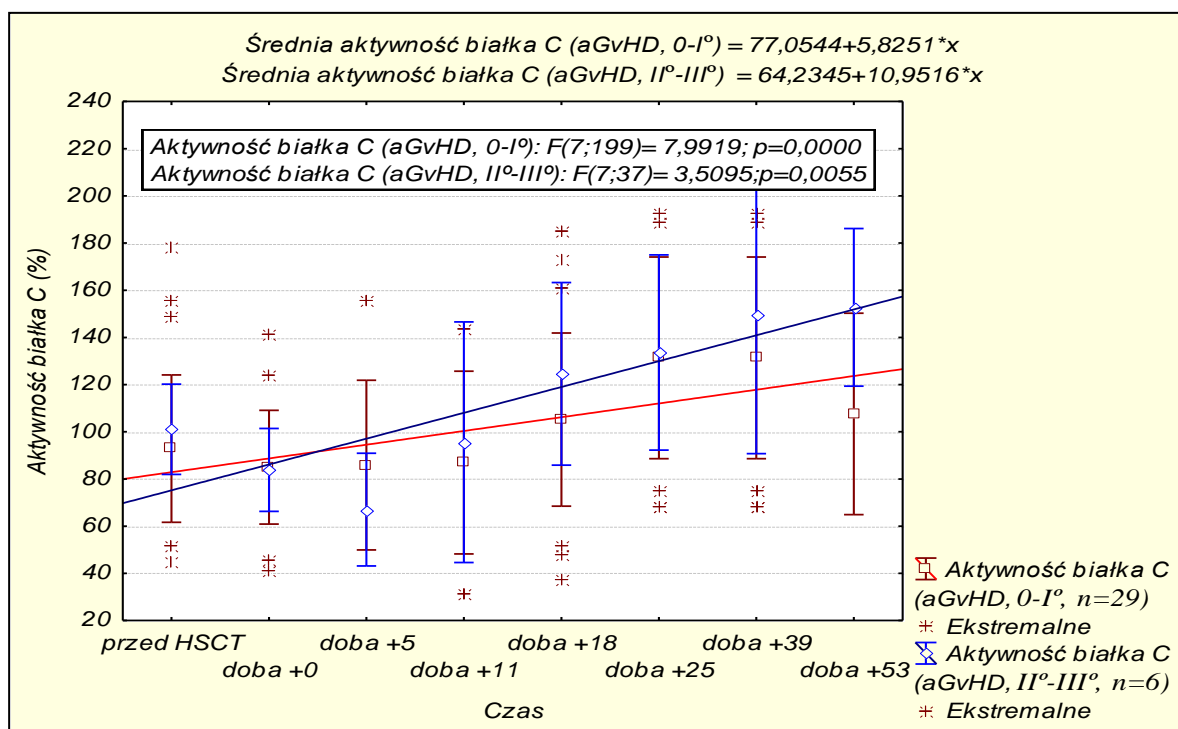
TRS – treosulfan.



Ryc. 4.1.2.b. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych wśród biorców: ATG + PBSC (n=10) vs. ATG + BM (n=4)

4.1.3. Aktywność białka C w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi

Nie wykazano istotnych różnic statystycznych aktywności PC w poszczególnych punktach czasowych pomiędzy pacjentami z aGvHD stopnia 0-I z pacjentami z aGvHD w stopniu II-III – Ryc. 4.1.3. i Tabela 4.1.3.



Ryc. 4.1.3. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

Tabela. 4.1.3. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnia aktywność białka C (%)	aGvHD 0-I° (n=23)	92,7 ± 31,2	85 ± 24,1	85,9 ± 35,9	87 ± 38,7	105,2 ± 36,7	131,3 ± 42,7	124,3 ± 45,2	107,6 ± 42,7
	aGvHD II°-III° (n=6)	101,1 ± 19,1	83,8 ± 17,6	67 ± 23,9	95,6 ± 51	124,6 ± 38,7	133,6 ± 41,4	149,7 ± 58,9	152,8 ± 33,4
P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

aGvHD – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi,

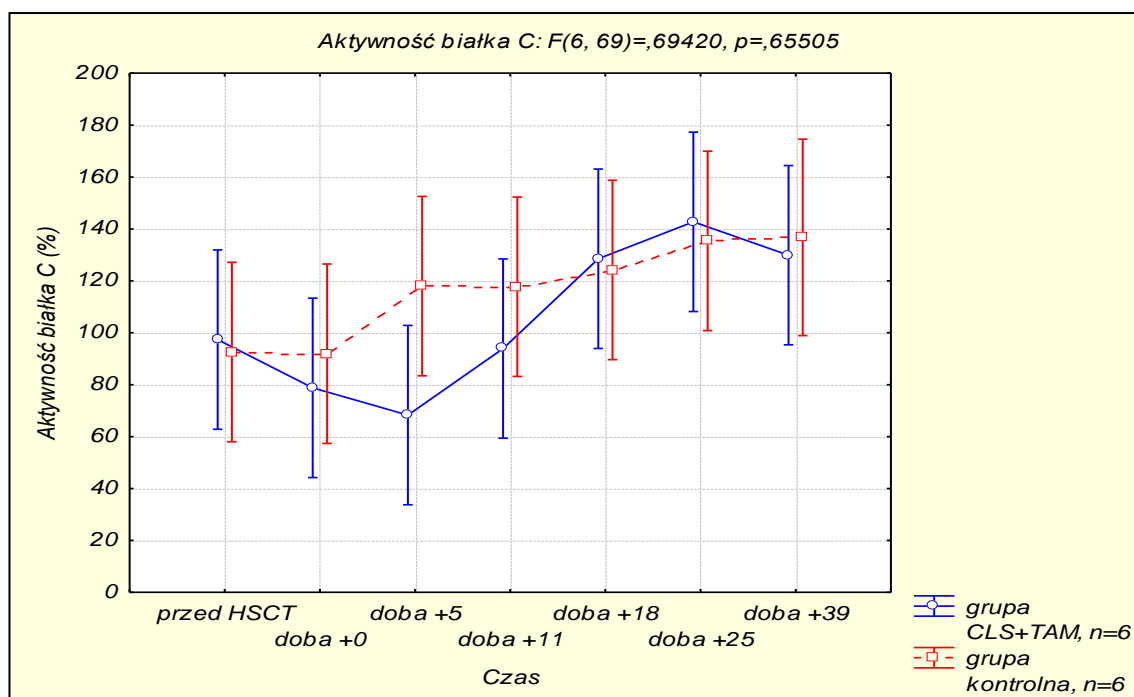
HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.1.4. Aktywność białka C w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonek

Stwierdzono, że w dobie +5 aktywność PC u pacjentów z wczesnymi powikłaniami po HSCT związanymi z uszkodzeniem śródbłonek, tj. z CLS, TAM była znacząco niższa w stosunku do spostrzeganej w grupie kontrolnej ($p=0,041$) (Ryc. 4.1.4. i Tabela 4.1.4.).

Średnia aktywność PC w dniu stwierdzonego powikłania ($77,4\pm 40,8\%$) (dzień (+5)-(+11), mediana dzień +11) nie różniła się istotnie od średniej aktywności PC przed rozpoczęciem kondycjonowania ($97,4\pm 42,3\%$). Średnia aktywność PC w dniu stwierdzonego powikłania była znacząco niższa ($77,4\pm 40,8\%$) w porównaniu z aktywnością spostrzeganą w dniu poprawy, ustąpienia objawów klinicznych wyżej wymienionych powikłań ($122,8\pm 42,9\%$) ($p=0,049$).



Ryc. 4.1.4. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

Tabela. 4.1.4. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnia aktywność białka C (%)	CLS + TAM (n=6)	97,4 ± 42,3	78,8 ± 22,3	68,3 ± 29,9	93,9 ± 52,2	128,5 ± 50,1	142,8 ± 47,5	129,9 ± 58,7
	Grupa kontrolna (n=6)	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5
P		NS	NS	0,041	NS	NS	NS	NS

CLS - zespół przesiąkania włósniczek,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

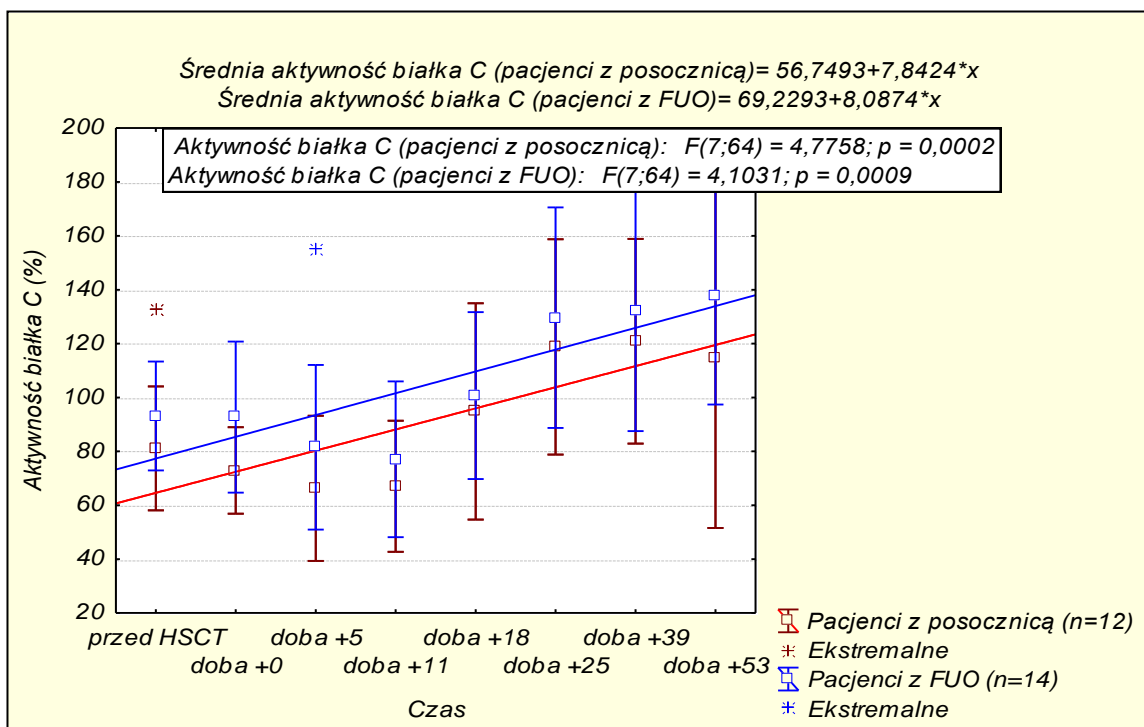
NS – brak znamienności statystycznej,

TAM – mikroangiopatia zakrzepowa.

4.1.5. Aktywność białka C w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

Aktywność PC w dobie 0 była znamienne wyższa wśród pacjentów ze stwierdzoną FUO w okresie potransplantacyjnym (dzień (+5)-(+18), mediana dzień +11) w stosunku do pacjentów z posocznicą (dzień (+5)-(+39), mediana dzień +8) Aktywność PC osiągnęła minimum w dobie +11 u pacjentów z FUO, a w dobie +5 u pacjentów z rozpoznaną w okresie potransplantacyjnym posocznicą. W kolejnych punktach czasowych, zarówno u pacjentów z FUO i posocznicą, odpowiednio od doby +18 oraz od doby +11, obserwowano wzrost aktywności PC. Aktywność PC wśród pacjentów z FUO i posocznicą osiągnęła stabilną wartość od doby +25 (Ryc. 4.1.5. i Tabela 4.1.5.c.).

Średnia aktywność PC w pierwszym dniu FOU (dzień (+5)-(+18), mediana dzień 11) wynosiła $78,5 \pm 23,6\%$ i była istotnie wyższa od aktywności PC w pierwszej dobie posocznicy (dzień (+5)-(+39), mediana dzień +8) $49,5 \pm 12,2\%$ ($p=0,002$). Aktywność PC była znamienne wyższa w momencie poprawy klinicznej tzn. po zakończeniu leczenia FOU (dzień (+18)-(+39), mediana dzień +25) ($78,5 \pm 23,6\%$ vs $113,8 \pm 33,3$, $p=0,003$), jak i posocznicy (dzień (+18)-(+53), mediana dzień +25) ($49,5 \pm 12,2\%$ vs $113,5\% \pm 30\%$, $p<0,001$) w stosunku do aktywności PC w pierwszym dniu stwierdzonego powikłania.



Ryc. 4.1.5. Aktywność białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FOU (n=14) vs posocznicą (n=12)

Średnia aktywność PC u pacjentów z posocznicą była znamienne niższa w +5 dobie po allo-HSCT od aktywności PC w tej dobie w grupie kontrolnej ($p=0,014$) (Tabela 4.1.5.a. i Tabela 4.1.5.b.).

4.1.5.a. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnia aktywność białka C (%) ± SD	FUO (n=14)	93,2 ± 20,2	92,7 ± 28	81,5 ± 30,6	77,1 ± 28,9	100,7 ± 31	129,6 ± 40,9	132,1 ± 44,6	138,1 ± 40,7
	Grupa kontrolna (n=6)	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5	NT
	p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

FUO – gorączka o niestalonej etiologii,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

4.1.5.b. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z posocznicą (n=12) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnia aktywność białka C (%) ± SD	Posocznica (n=12)	81,1 ± 23	72,9 ± 16,1	66,3 ± 26,9	67,1 ± 24,3	94,8 ± 40,1	118,8 ± 39,9	120,9 ± 38	114,5 ± 62,9
	Grupa kontrolna (n=6)	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5	NT
	p	NS	NS	0,014	NS	NS	NS	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

4.1.5.c. Średnie aktywności białka C w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs posocznica (n=12)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnia aktywność białka C (%) ± SD	FUO (n=14)	93,2 ± 20,2	92,7 ± 28	81,5 ± 30,6	77,1 ± 28,9	100,7 ± 31	129,6 ± 40,9	132,1 ± 44,6	138,1 ± 40,7
	Posocznica (n=12)	81,1 ± 23	72,9 ± 16,1	66,3 ± 26,9	67,1 ± 24,3	94,8 ± 40,1	118,8 ± 39,9	120,9 ± 38	114,5 ± 62,9
	p	NS	0,048	NS	NS	NS	NS	NS	NS

FUO – gorączka o niestalonej etiologii,

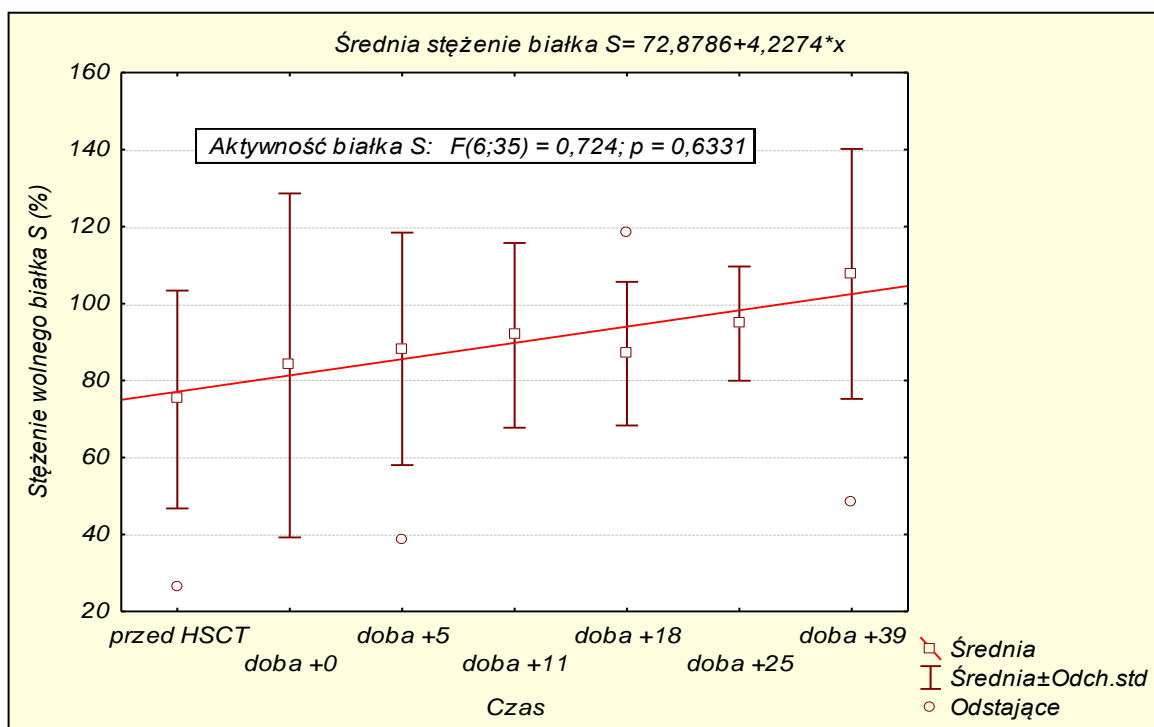
HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.2. Białko S

4.2.1. Stężenie wolnego białka S w osoczu w grupie kontrolnej

Nie wykazano istotnych różnic średnich stężeń wolnego PS w grupie kontrolnej we wczesnym okresie potransplantacyjnym w stosunku do średniego stężenia wolnego PS spostrzeganego przed HSCT. Najwyższe stężenie wolnego PS obserwowano w dobie +39. Średnie stężenie wolnego PS w poszczególnych punktach czasowych w grupie kontrolnej pozostawało w granicach normy (>50%) (Ryc. 4.2.1. i Tabela 4.2.1.).



Ryc. 4.2.1. Stężenie wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

Tabela. 4.2.1. Porównanie średniego stężenia wolnego białka S w osoczu przed rozpoczęciem kondycjonowania ze stężeniami wolnego białka S w innych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

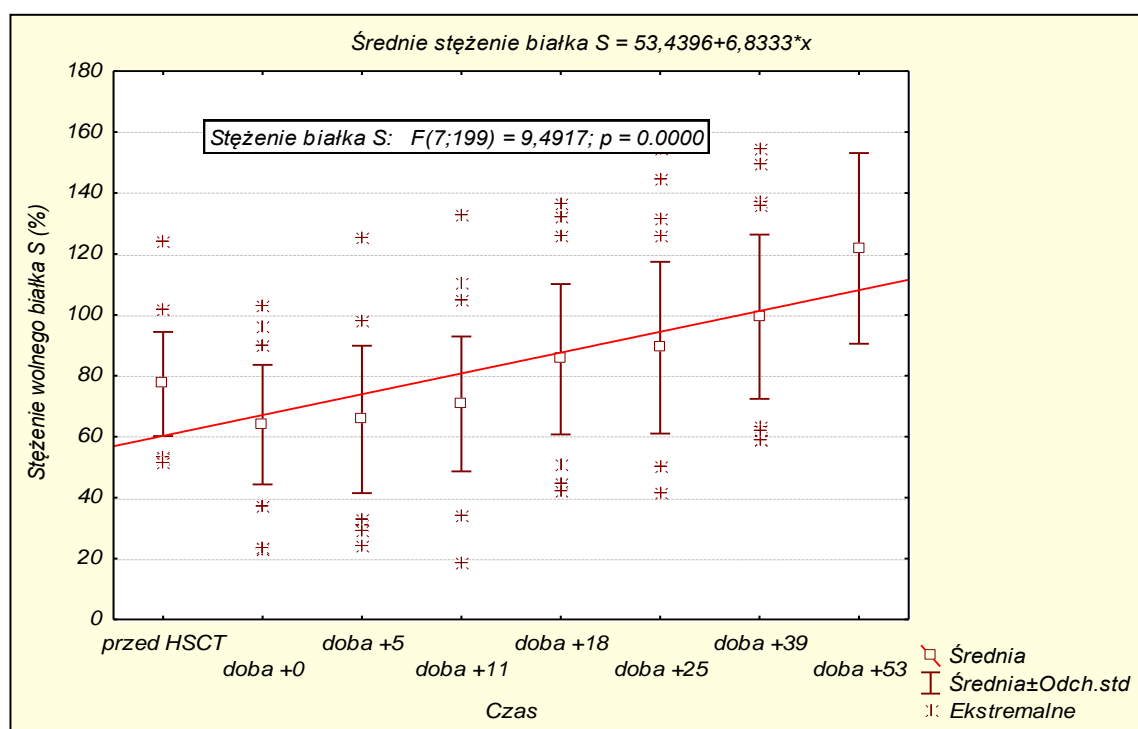
	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnie stężenie wolnego białka S (%) ± SD	75,1 ± 28,3	83,9 ± 44,7	88,3 ± 30,2	91,8 ± 24	87 ± 18,7	94,8 ± 14,8	107,7 ± 32,5
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.2.2. Stężenie wolnego białka S w osoczu w grupie badanej

Średnie stężenie wolnego PS przed rozpoczęciem kondycjonowania było w granicach normy. Średnie stężenie wolnego PS uległo obniżeniu w dobach: 0, +5 oraz +11 w porównaniu do okresu przed HSCT (brak znamienności statystycznej). Stężenie wolnego PS było znamienne wyższe w dobie +39 w porównaniu ze stężeniem wolnego PS przed rozpoczęciem kondycjonowania ($p=0,009$). Średnie stężenie wolnego PS osiągnęło maksimum w dobie +53. Wykazano następujące istotne różnice statystyczne stężeń wolnego PS: doba 0 vs +18, 0 vs +25, 0 vs +39, 0 vs +53, +5 vs +18, +5 vs 25, +5 vs +39, +5 vs +53, +11 vs +39, +11 vs +53, $p<0,05$) (Ryc. 4.2.2.a. i Tabela. 4.2.2.a.).



Ryc. 4.2.2.a. Stężenie wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie badanej (n=29)

Tabela. 4.2.2.a. Porównanie średniego stężenia wolnego białka S w osoczu przed rozpoczęciem kondycjonowania ze stężeniami wolnego białka S w innych punktach czasowych w grupie badanej

	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie wolnego białka S (%) ± SD	77,3 ± 17,1	64 ± 19,6	65,7 ± 24,2	70,8 ± 22,1	85,4 ± 24,7	89,2 ± 28,2	99,4 ± 27	121,8 ± 31,3
p		NS	NS	NS	NS	NS	0,009	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

Analiza stężeń wolnego PS wykazała (Tabela 4.2.2.b.):

- znamienne niższe stężenie wolnego PS w dobach +5 oraz +11 u pacjentów z chorobami rozrostowymi w porównaniu z dziećmi z chorobami nierozrostowymi,

- stężenie wolnego PS u biorców HSC od MSD było niższe w dobach +5 oraz +11 w stosunku do biorców MUD-HSC,

- istotnie niższe stężenie wolnego PS w dobie +25 u biorców HSC pochodzących z PB w stosunku do birców BM,

- niższe stężenie PS w dobie +5, u pacjentów, u których w kondycjonowaniu nie użyto ATG.

Stężenie wolnego PS u biorców komórek pochodzących ze BM od MSD (n=10) w porównaniu z biorcami BM od MUD (n=4) w dobach +5 oraz +11 było statystycznie niższe (p=0,024, p=0,04).

Anliza statystyczna wykazała, że stężenie wolnego PS w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów, u których w przygotowaniu do HSCT zastosowano ATG, a źródłem komórek krwiotwórczych był BM, było istotnie wyższe w porównaniu do pacjentów, u których źródłem komórek była PB (Ryc. 4.2.2.b.).

Tabela 4.2.2.b. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w zależności od analizowanych zmiennych

ANALIZOWANE ZMIENNE	ŚREDNIE STĘŻENIE WOLNEGO BIAŁKA S (%)							
	PRZED HSCT	DOBA 0	DOBA +5	DOBA +11	DOBA +18	DOBA +25	DOBA +39	DOBA +53
CHOROBY ROZROSTOWE n=25	76,9	62,7	62,8	70	84,7	89,8	99	110,9
CHOROBY NIEROZROSTWE n=4	76,9	83,2	92,3	89	89,2	91,5	106,7	NA
P	NS	NS	0,004	0,029	NS	NS	NS	NS
MSD n=13	75,3	60,8	55,3	64,5	88,1	96,2	96,7	106,5
MUD n=14	79,2	73,7	81,1	83,2	86	88	106	119,8
P	NS	NS	0,05	0,026	NS	NS	NS	NS
FTBI n=9	78	62,1	53,6	69,3	85	89,1	96,1	106,5
BU n=12	75,6	56,2	66,9	64,6	79,5	84	95,9	119,8
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TRS n=5	71,8	78,4	66,7	77,8	87,7	93,1	110,9	NA
BU n=12	75,6	56,2	66,9	64,6	79,5	84	95,9	119,8
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ATG (+) n=14	77,3	68,2	77,2	81	83,1	84,3	103,4	137,2
ATG (-) n=15	76,5	65,2	60,4	66,5	88,8	97,1	97,7	106,5
P	NS	NS	0,042	NS	NS	NS	NS	NS
BM n=15	74,2	66,2	62,8	72,7	90	97,8	98,7	122,5
PBSC n=13	79,9	67,3	77,3	74,4	78,7	80,6	100,3	119,8
P	NS	NS	NS	NS	NS	0,05	NS	NS
CD 34+ <3 x 10 ⁶ /kg n=7	80,4	66,2	73,4	78,9	86,2	90	98,1	117,4
CD 34+ ≥3 x 10 ⁶ /kg n=21	75,3	67,9	67,8	72,3	85,5	90,2	102,1	126,3
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

BU – busulfan,

BM - szpik kostny

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

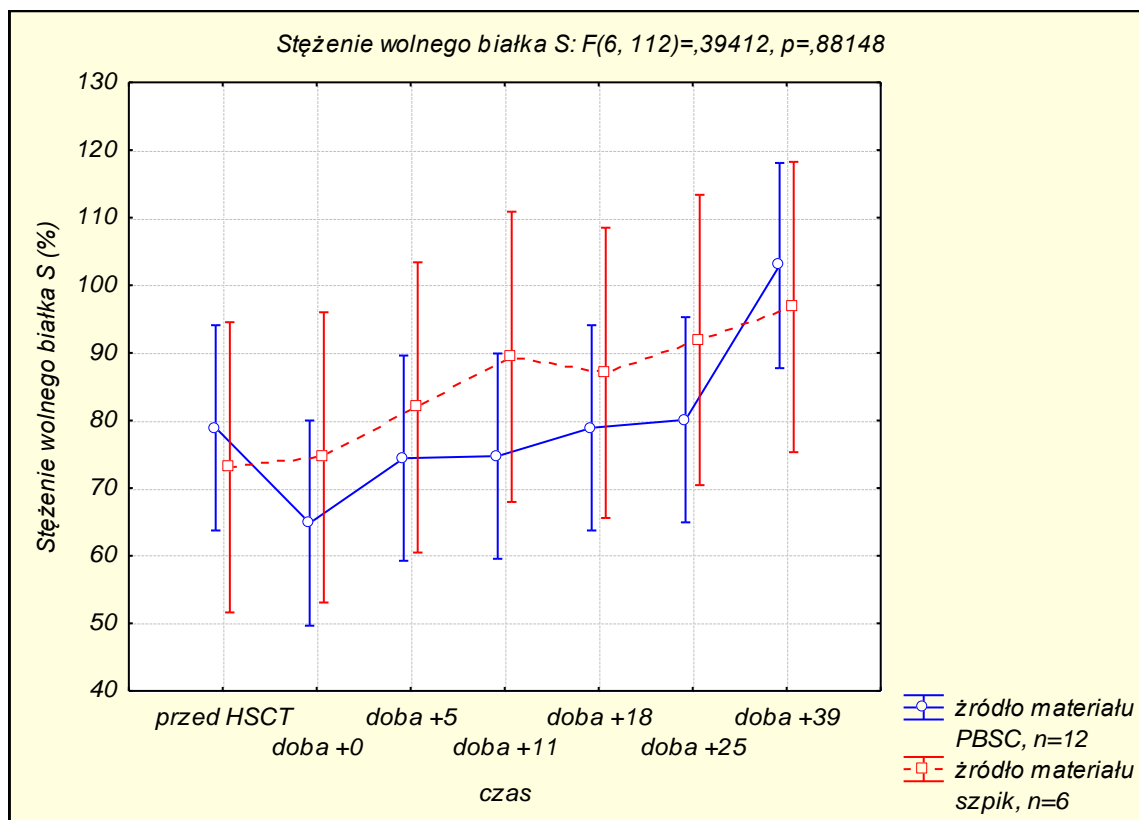
MSD - w pełni zgodny dawca rodzinny,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

NS – brak znamienności statystycznej,

PBSC - komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej,

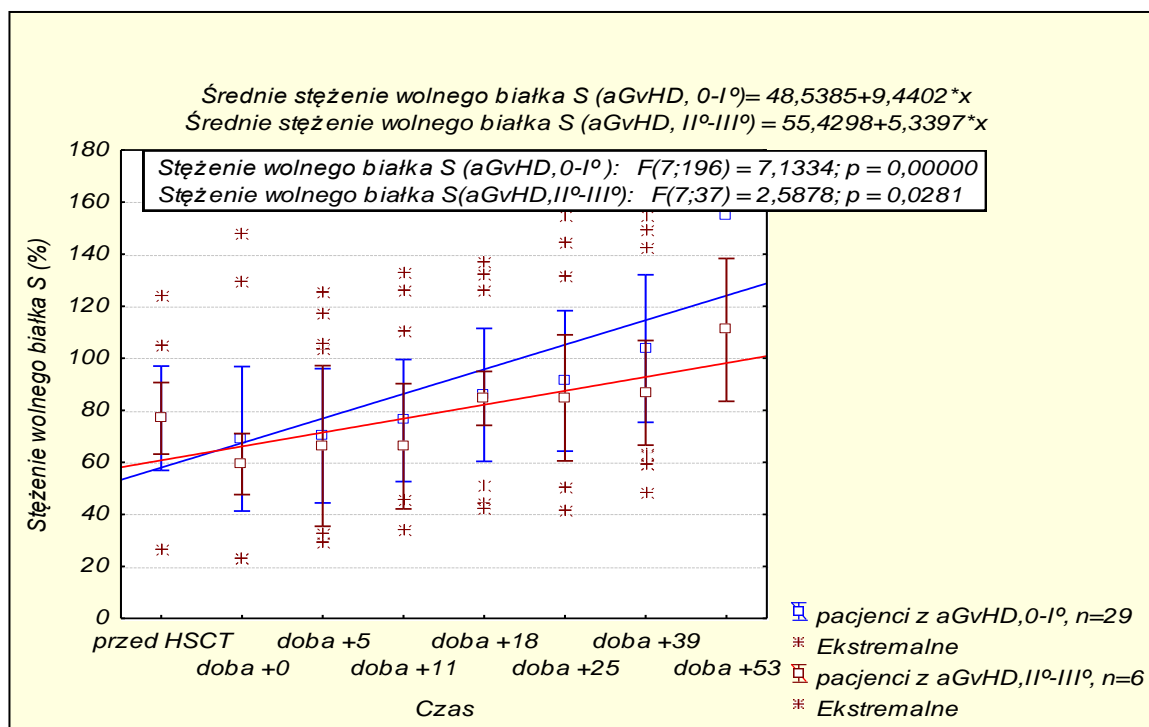
TRS – treosulfan.



Ryc. 4.2.2.b. Stężenie wolnego białka S w w osoczu poszczególnych punktach czasowych wśród biorców: ATG+PBSC (n=10) vs. ATG + BM (n=4)

4.2.3. Stężenie wolnego białka S w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi

Stężenia wolnego PS w poszczególnych punktach czasowych nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentami z aGvHD stopnia 0-I a pacjentami z aGvHD stopnia II-III (Ryc. 4.2.3. i Tabela 4.2.3.).



Ryc. 4.2.3. Stężenie wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

Tabela. 4.2.3. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie wolnego białka S (%)	aGvHD 0-I° (n=23)	76,9 ± 20	69,1 ± 27,8	70,2 ± 25,8	76 ± 23,5	85,9 ± 25,5	91,3 ± 27	103,7 ± 28,3	155 ± 0
	aGvHD II°-III° (n=6)	76,9 ± 13,8	59,3 ± 11,7	66,3 ± 30,6	66,2 ± 24,1	84,6 ± 10,4	84,8 ± 24,2	86,7 ± 20,1	110,9 ± 27,5
SD									
P		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

aGvHD – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi,

HSCT- transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

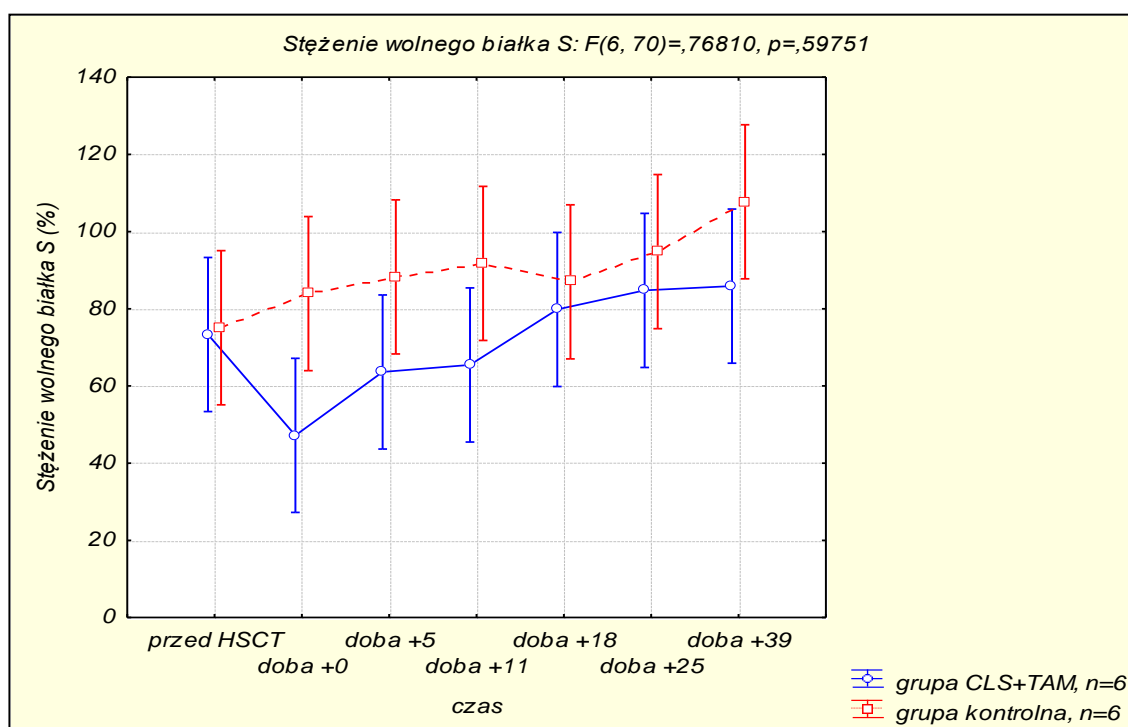
NS – brak znamienności statystycznej.

4.2.4. Stężenie wolnego białka S w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonek

Stężenie wolnego PS nie różniło się istotnie w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z wczesnymi powikłaniami HSCT związanymi z uszkodzeniem śródbłonek ($p=0,057$). Analiza statystyczna wykazała istotnie niższe stężenie wolnego PS u dzieci z CLS oraz TAM w stosunku do grupy kontrolnej w dobie +11 (Ryc. 4.2.4. i Tabela 4.2.4.).

Nie wykazano różnic statystycznych średnich stężeń PS w dniu stwierdzonego powikłania (dzień (+5)-(+11), mediana dzień 11) ($53,8\pm 20,4\%$) w stosunku do średniego stężenia PS przed rozpoczęciem kondycjonowania ($73,3\pm 15,2\%$).

Średnie stężenie wolnego PS w dniu potwierdzenia CLS lub TAM było znamienne niższe ($53,8\pm 20,4\%$) w stosunku do dnia poprawy stanu klinicznego dziecka ($91,6\pm 24,6\%$) ($p=0,016$).



Ryc. 4.2.4. Stężenie wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

Tabela. 4.2.4. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnie stężenie wolnego białka S (%)	CLS + TAM (n=6)	73,3	47,2	63,6	65,5	79,8	84,8	85,9
	Grupa kontrolna (n=6)	75,1	83,9	88,3	91,8	87	94,8	107,7
± SD		± 15,2	± 15	± 26,6	± 17,2	± 17,7	± 16,6	± 21,5
		± 28,3	± 44,7	± 30,2	± 24	± 18,7	± 14,8	± 32,5
p		NS	NS	NS	0,041	NS	NS	NS

CLS – zespół przesiąkania włósniczek,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

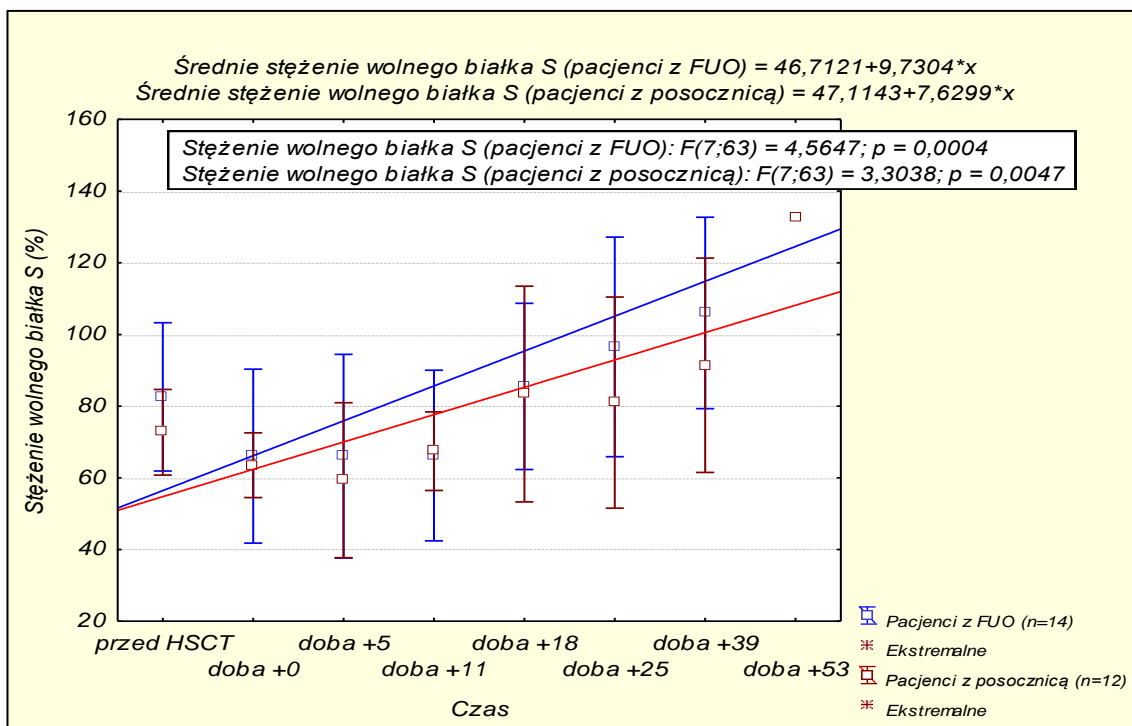
NS – brak znamienności statystycznej,

TAM - mikroangiopatia zakrzepowa.

4.2.5. Stężenie wolnego białka S w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

Nie stwierdzono znamienych różnic statystycznych w stężeniach wolnego PS pomiędzy pacjentami z FUO a posocznicą. U pacjentów z FOU i posocznicą minimalne stężenie wolnego PS obserwowano w dobie +5. Od doby +11 stężenie PS wzrastało, osiągając maksimum w dobie +39 (Ryc.4.2.5 i Tabela 4.2.5.c.).

Stężenie wolnego PS w pierwszym dniu FUO (dzień (+5)-(+18), mediana dzień 11), w porównaniu ze stężeniem wolnego PS w posocznicy (dzień (+5)-(+39), mediana dzień +8) nie różniło się istotnie ($66,9 \pm 20\%$ vs $54,2 \pm 17,4\%$). Stężenie wolnego PS było znamienne wyższe po zakończeniu leczenia posocznicy (dzień (+18)-(+53), mediana dzień +25) w stosunku do stężenia w dniu, w którym rozpoznano powyższe powikłanie (dzień (+5)-(+39), mediana dzień +8) ($54,2 \pm 17,4\%$ vs $94,6 \pm 24,7\%$, $p < 0,001$). Nie stwierdzono natomiast różnic stężeń wolnego PS po zakończeniu leczenia FUO (dzień (+18)-(+39), mediana dzień +25) w stosunku do stężeń w pierwszej dobie FUO (dzień (+5)-(+18), mediana dzień 11) ($85,4 \pm 29,3\%$ vs $66,9 \pm 20\%$).



Ryc. 4.2.5. Stężenie wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs posoczną (n=12)

Średnie stężenie wolnego PS było znacznie niższe w 5 dobie po allo-HSCT u pacjentów z posoczną w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 4.2.5.a; Tabela 4.2.5.b. i Tabela 4.2.5.c.).

4.2.5.a. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie wolnego białka S (%) ± SD	FUO (n=14)	82,6 ± 20,7	66,1 ± 24,3	66 ± 28,4	66,2 ± 23,8	85,5 ± 23,2	96,5 ± 30,6	106 ± 26,7	155
	Grupa kontrolna (n=6)	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5	NT
	p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NT

FUO – gorączka o nieznannej etiologii,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

4.2.5.b. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z posocznicą (n=12) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie wolnego białka S (%) ± SD	Posocznica (n=12)	72,7 ± 19,1	63,5 ± 9	59,3 ± 21,6	67,4 ± 11	83,4 ± 30,1	81 ± 29,4	91,4 ± 29,9	132,8
	Grupa kontrolna (n=6)	92,6 ± 26,6	91,9 ± 16,2	118 ± 47,4	117,7 ± 49,7	124,2 ± 23,9	135,4 ± 50	136,8 ± 49,5	NT
	P	NS	NS	0,029	NS	NS	NS	NS	NT

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

Tabela. 4.2.5.c. Średnie stężenia wolnego białka S w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs posocznicą (n=12)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie wolnego białka S (%) ± SD	FUO (n=14)	82,6 ± 20,7	66,1 ± 24,3	66 ± 28,4	66,2 ± 23,8	85,5 ± 23,2	96,5 ± 30,6	106 ± 26,7	155
	Posocznica (n=12)	72,7 ± 19,1	63,5 ± 9	59,3 ± 21,6	67,4 ± 11	83,4 ± 30,1	81 ± 29,4	91,4 ± 29,9	132,8
	p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

FUO – gorączka o niestalonej etiologii,

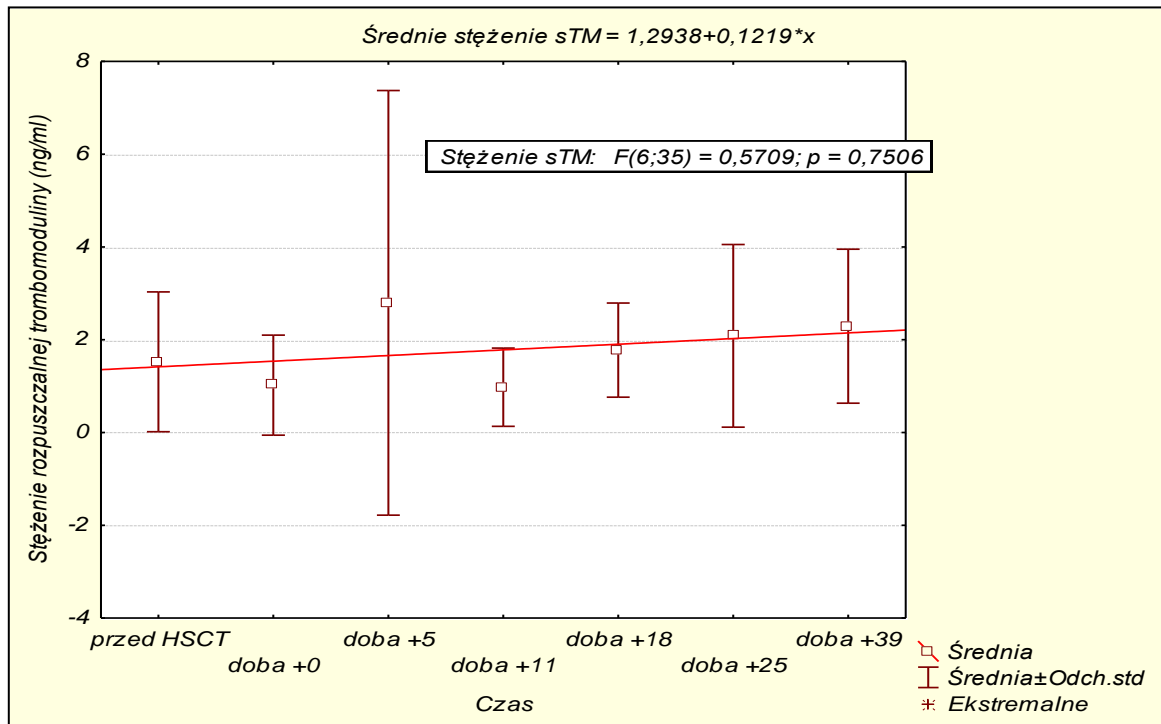
HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.3. Trombomodulina

4.3.1. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w grupie kontrolnej

Średnie stężenie sTM w w grupie kontrolnej w okresie przedtransplantacyjnym było poniżej wartości referencyjnych (<2,79 ng/ml). Nie wykazano istotnych różnic średnich stężeń sTM w grupie kontrolnej we wczesnym okresie potransplantacyjnym w stosunku do średniego stężenia wolnego sTM spostrzeganego przed HSCT. Średnie stężenie sTM osiągnęło maksimum w dobie +5 po allo-HSCT i było w granicach wartości normalnych (2,79 – 4,73 ng/ml). Średnie stężenie sTM w kolejnych punktach czasowych w dobach: +11, +18, +25, +39 było poniżej normy (Ryc. 4.2.1. i Tabela 4.2.1.).



Ryc. 4.3.1. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

Tabela. 4.3.1. Porównanie średniego stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu przed rozpoczęciem kondycjonowania ze średnimi stężeniami rozpuszczalnej trombomoduliny w innych punktach czasowych w grupie kontrolnej (n=6)

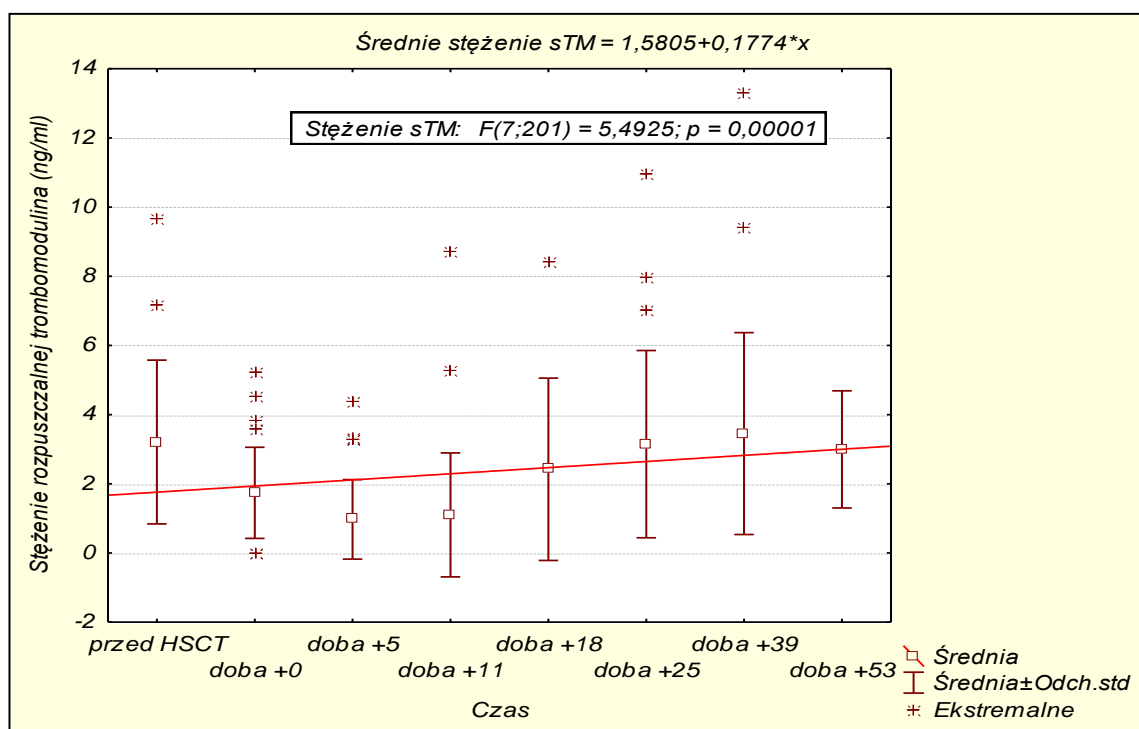
	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnie stężenie sTM (ng/ml)	1,52	1,02	2,79	0,98	1,78	2,09	2,29
± SD	± 1,51	± 1,08	± 4,58	± 0,84	± 1,02	± 1,97	± 1,66
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.3.2. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w grupie badanej

Średnie stężenie sTM w grupie badanej przed rozpoczęciem kondycjonowania było w granicach wartości referencyjnych. Średnie stężenie sTM uległo znamiennej obniżeniu w dobach: +5, +11 w porównaniu do okresu przed HSCT ($p < 0,001$). Stężenie sTM osiągnęło wartość minimalną w dobie +5, a wartość maksymalną w dobie +39. Wykazano następujące istotne statystycznie różnice stężeń sTM: +5 vs +18, +5 vs +25, +5 vs 39, +5 vs 53, +11 vs +25, +11 vs +39, $p < 0,05$) (Ryc. 4.3.2. i Tabela 4.3.2.a).



Ryc. 4.3.2. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w grupie badanej (n=29)

Tabela. 4.3.2.a. Porównanie średniego stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu przed rozpoczęciem kondycjonowania ze średnimi stężeniami rozpuszczalnej trombomoduliny w innych punktach czasowych w grupie badanej (n=29)

	Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie sTM (ng/ml) ± SD	3,21 ± 2,37	1,74 ± 1,32	0,97 ± 1,15	1,1 ± 1,79	2,42 ± 2,64	3,14 ± 2,71	3,45 ± 2,92	2,99 ± 1,69
p		NS	<0,001	<0,001	NS	NS	NS	NS

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

Nie wykazano różnic statystycznych stężeń sTM w poszczególnych grupach pacjentów: z chorobą rozrostową vs. nierozrostową, po MSD-HSCT vs MUD-HSCT, kondycjonowanych FTBI vs. BU, TRS vs. BU, ATG (+) vs. ATG (-), po transplantacji HSC z BM vs PBSC, $<3 \times 10^6/\text{kg}$ vs. $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ (Tabela 4.3.2.b.).

Tabela 4.3.2.b. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych w zależności od analizowanych zmiennych

ANALIZOWANE ZMIENNE	ŚREDNIE STĘŻENIE ROZPUSZCZALNEJ TROMBOMODULINY (ng/ml)							
	PRZED HSCT	DOBA 0	DOBA +5	DOBA +11	DOBA +18	DOBA +25	DOBA +39	DOBA +53
CHOROBY ROZROSTOWE n=25	2,94	1,71	1,08	1,16	2,49	3,04	3,31	3,41
CHOROBY NIEROZROSTWE n=4	2,87	1,29	1,97	0,81	1,7	2,69	3,06	2,18
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MSD n=13	2,97	0,59	0,51	0,4	1,4	1,55	2,47	1,46
MUD n=14	3,61	2,11	1,22	0,73	2,55	2,8	3,28	3,76
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FTBI n=9	3,02	1,19	1,21	1,11	2,28	3,07	4,61	3,97
BU n=12	2,89	1,76	0,7	0,61	2,55	2,82	2,90	4,22
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TRS n=5	3,05	1,79	1,12	0,87	1,49	1,89	2,07	1,46
BU n=12	2,89	1,76	0,7	0,61	2,55	2,82	2,9	4,22
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ATG (+) n=14	2,52	1,45	1,32	1,35	2,25	3,29	3,48	3,0
ATG (-) n=15	3,39	1,81	1,24	0,75	2,38	2,58	2,98	2,99
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BM n=15	3,29	1,96	1,87	1,26	2,48	3,05	3,15	3,76
PBSC n=13	2,28	1,14	0,62	0,92	2,24	2,8	3,31	2,23
P	NS	NS	NS	NS	NS	0,05	NS	NS
CD 34+ <3 x 10 ⁶ /kg n=7	3,62	2,26	1,19	1,49	3,14	4,08	3,68	4,41
CD 34+ ≥3 x 10 ⁶ /kg n=21	2,64	1,36	1,323	0,91	1,97	2,51	3,08	2,29
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

ATG - globulina przeciwtymocytarna,

BU – busulfan,

BM - szpik kostny,

FTBI – frakcjonowane naświetlanie całego ciała,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

MSD - w pełni zgodny dawca rodzinny,

MUD - w pełni zgodny dawca niespokrewniony,

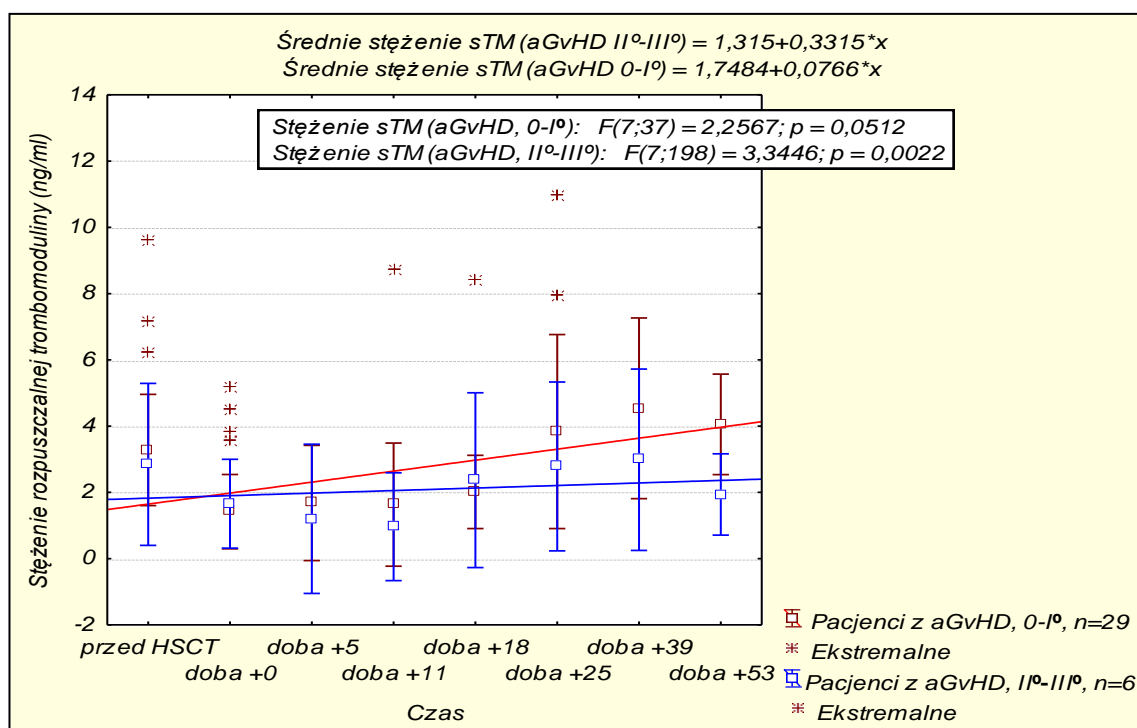
NS – brak znamienności statystycznej,

PBSC - komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej,

TRS – treosulfan.

4.3.3. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w ostrej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic stężeń sTM w poszczególnych punktach czasowych pomiędzy dziećmi z aGvHD (0-I°) a pacjentami z aGvHD (II°-III°). W obu grupach pacjentów stężenie sTM spadało, osiągając minimalną wartość w dobie +11, a następnie od doby +18 wzrastało do doby +39, kiedy uzyskało maksimum (Ryc.4.3.3. i Tabela 4.3.3.).



Ryc. 4.3.3. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

Tabela. 4.3.3. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z aGvHD (0-I°, n=23) vs aGvHD (II°-III°, n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie sTM (ng/ml)	aGvHD 0-I° (n=23)	2,84 ±	1,66 ±	1,2 ±	0,96 ±	2,37 ±	2,78 ±	2,98 ±	1,93 ±
	aGvHD II°-III° (n=6)	2,44	1,34	2,25	1,62	2,63	2,54	2,73	1,22
± SD		3,28 ±	1,42 ±	1,68 ±	1,63 ±	2,01 ±	3,84 ±	4,54 ±	4,05 ±
p		1,67	1,12	1,74	1,86	1,1	2,93	2,73	1,52
		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

aGvHD – ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi,

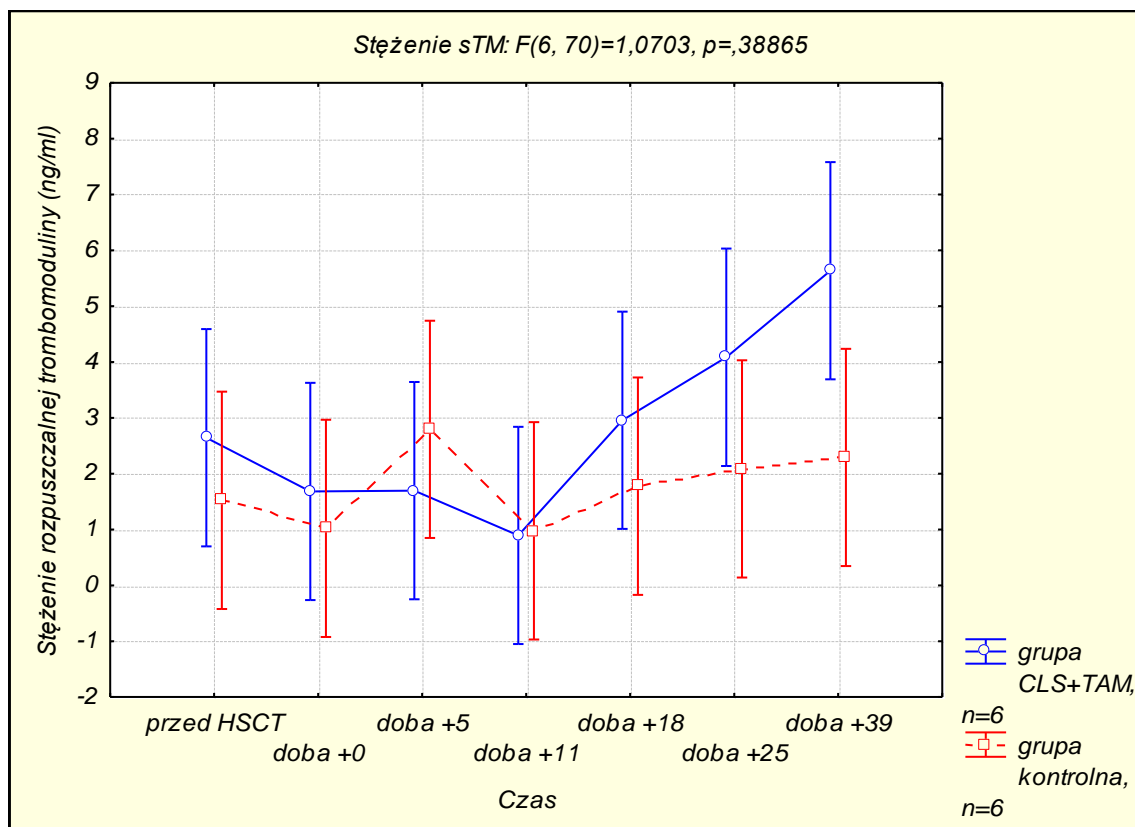
HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.3.4. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu we wczesnych powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonnków

Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic stężeń sTM w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z wczesnymi powikłaniami HSCT związanymi z uszkodzeniem śródbłonnków ($p=0,056$). Nie stwierdzono również istotnych różnic stężeń sTM u pacjentów z CLS i TAM w poszczególnych punktach czasowych w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 4.3.4. i Tabela 4.3.4.).

Średnie stężenia sTM nie różniły się statystycznie w dniu diagnozy CLS, TAM ($3,2\pm 3,1$ ng/ml) (dzień (+5)-(+11), mediana dzień 11) w porównaniu do średniego stężenia sTM przed rozpoczęciem kondycjonowania ($2,65\pm 1,87$ ng/ml) ($p=ns$) oraz w dniu poprawy klinicznej ($2,8\pm 3,6$ ng/ml) ($p=ns$).



Ryc. 4.3.4. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

Tabela. 4.3.4. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z CLS oraz TAM (n=6) vs grupa kontrolna (n=6)

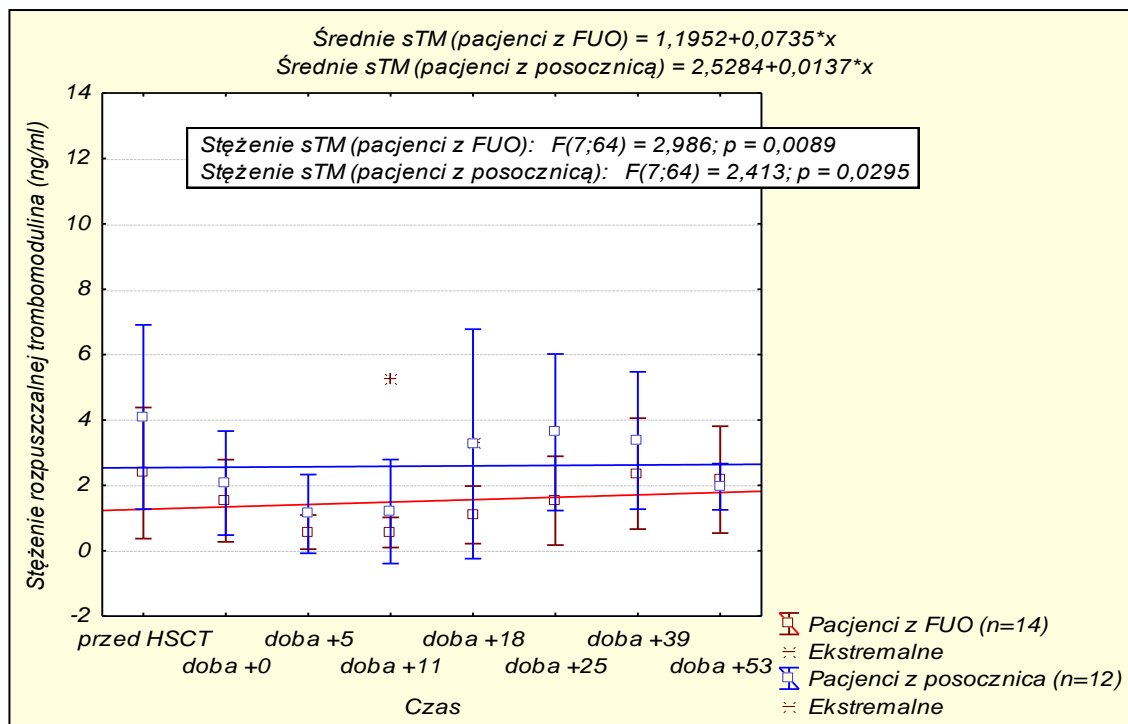
		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39
Średnie stężenie sTM (ng/ml)	CLS + TAM (n=6)	2,65	1,68	1,69	0,89	2,96	4,09	5,63
	Grupa kontrolna (n=6)	1,52	1,02	2,79	0,98	1,78	2,09	2,29
± SD		± 1,51	± 1,08	± 4,58	± 0,84	± 1,02	± 1,97	± 1,66
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

CLS – zespół przesiąkania włóścińcek,
 NS – brak znamienności statystycznej,
 TAM – mikroangiopatia zakrzepowa.

4.3.5. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w powikłaniach infekcyjnych po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych

Analiza stężeń sTM w grupie pacjentów ze stwierdzoną w okresie potransplantacyjnym posocznicą w porównaniu z dziećmi z FUO, wykazało znamienne wyższe stężenia sTM w dobie +18 oraz +25 u pacjentów z posocznicą (Ryc. 4.3.5. i Tabela 4.3.5.c.).

Średnie stężenia sTM w pierwszym dniu FUO (dzień (+5)-(+18), mediana dzień +11) w porównaniu ze średnimi stężeniami sTM w pierwszej dobie posocznicy (dzień (+5)-(+39), mediana dzień +8) nie różniły się istotnie ($0,78 \pm 0,88$ ng/ml vs $1,11 \pm 1,14$ ng/ml). Średnie stężenia sTM były znamienne wyższe w momencie poprawy klinicznej tzn. po zakończeniu leczenia FUO (dzień (+18)-(+39), mediana dzień +25) ($0,78 \pm 0,88$ ng/ml vs $2,61 \pm 2,26$ ng/ml, $p=0,009$), jak i posocznicy (dzień (+18)-(+53), mediana dzień +25) ($1,11 \pm 1,14$ ng/ml vs $3,01 \pm 2,3$ ng/ml, $p=0,018$) w porównaniu ze średnimi stężeniami w pierwszym dniu tych powikłań infekcyjnych.



Ryc. 4.3.5. Stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs posocznicą (n=12)

Nie wykazano różnic stężeń sTM w poszczególnych punktach czasowych pomiędzy pacjentami z FUO (n=14) a grupą kontrolną (n=6), posocznicą (n=12) a grupą kontrolną (n=6), FUO (n=14) a posocznicą (n=12) (Tabela 4.3.5.a; Tabela 4.3.5.b. i Tabela 4.3.5.c).

4.3.5.a. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie sTM (ng/ml) ± SD	FUO (n=14)	2,38 ± 2	1,53 ± 1,26	0,57 ± 0,52	0,56 ± 0,46	1,1 ± 0,88	1,53 ± 1,38	2,36 ± 1,7	2,18 ± 1,63
	Grupa kontrolna (n=6)	1,52 ± 1,51	1,02 ± 1,08	2,79 ± 4,58	0,98 ± 0,84	1,78 ± 1,02	2,09 ± 1,97	2,29 ± 1,66	NT
	p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
									NT

FUO – gorączka o nieznannej etiologii,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

4.3.5.b. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z posocznicą (n=12) vs grupa kontrolna (n=6)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie sTM (ng/ml) ± SD	Posocznica (n=12)	4,09 ± 2,82	2,07 ± 1,6	1,13 ± 1,2	1,2 ± 1,6	3,27 ± 3,5	3,62 ± 2,4	3,38 ± 2,0	1,96 ± 0,7
	Grupa kontrolna (n=6)	1,52 ± 1,51	1,02 ± 1,08	2,79 ± 4,58	0,98 ± 0,84	1,78 ± 1,02	2,09 ± 1,97	2,29 ± 1,66	NT
	p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
									NT

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej,

NT – nie badano.

Tabela. 4.3.5.c. Średnie stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w poszczególnych punktach czasowych u pacjentów z FUO (n=14) vs posocznicą (n=12)

		Przed HSCT	Doba 0	Doba +5	Doba +11	Doba +18	Doba +25	Doba +39	Doba +53
Średnie stężenie sTM (ng/ml) ± SD	FUO (n=14)	2,38 ± 2	1,53 ± 1,26	0,57 ± 0,52	0,56 ± 0,46	1,1 ± 0,88	1,53 ± 1,38	2,36 ± 1,7	2,18 ± 1,63
	Posocznica (n=12)	4,09 ± 2,82	2,07 ± 1,6	1,13 ± 1,2	1,2 ± 1,6	3,27 ± 3,5	3,62 ± 2,4	3,38 ± 2,0	1,96 ± 0,7
	p	NS	NS	NS	NS	0,047	0,027	NS	NS

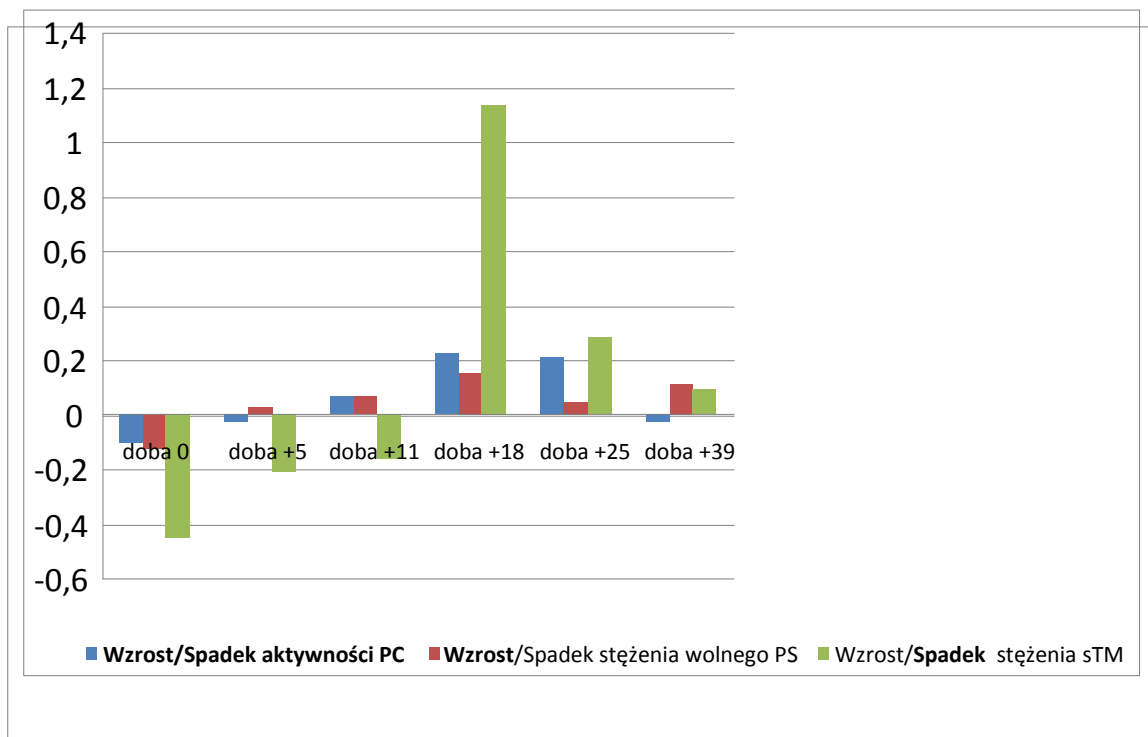
FUO – gorączka o nieznannej etiologii,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

NS – brak znamienności statystycznej.

4.4. Ocena korelacji profili aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu

Do oceny korelacji użyto testu Tau-Kendalla. Analizowano korelację pomiędzy seriami utworzonymi przez średnie wartości badanej zmiennej (aktywność PC, stężenie wolnego PS, stężenie sTM) dla danego punktu czasowego a procentowymi zmianami w wartościach analizowanych zmiennych w kolejnych punktach czasowych. Wykazano statystycznie istotną korelację między zmianą poziomów aktywności PC, stężeń wolnego PS i stężeń sTM (współczynnik korelacji Tau-Kendalla dla: aktywność PC vs stężenie wolnego PS= 0,809, aktywność PC vs stężenie sTM= 0,619, stężenie wolnego PS vs stężenie sTM= 0,619). Z przeprowadzonej analizy wynika, iż wzrost stężenia sTM ma miejsce z opóźnieniem (doba +18) w stosunku do wzrostu aktywności PC (doba +11) oraz wzrostu stężenia wolnego PS (doba +5) (Ryc. 4.4.).



Ryc. 4.4. Korelacja zmian poziomów aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny w osoczu w czasie

4.5. Oporność na aktywowane białko C, mutacja genu czynnika V (Leiden)

W badanej grupie oporność na aktywowane białko C (activated protein C resistance, APCr) wynosiła od 1,35 do 4,1 (mediana 2,57). Wartości poniżej 2 stwierdzono u 7 (24,1%) spośród 29 badanych pacjentów. U 7 (100%) dzieci ze stwierdzoną APCr potwierdzono obecność mutacji genu czynnika V (Leiden) (heterozygoty).

U 3 pacjentów, u których rozpoznano TAM, stwierdzono w okresie przedtransplantacyjnym APCr poniżej 2 ($p < 0,001$). U pozostałych 4 pacjentów z APCr, nie obserwowano w okresie potransplantacyjnym TAM. Nie wykazano znamiennej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem innych wczesnych powikłań po allo-HSCT (CLS, FUO, posocznica, MODS) a stwierdzoną APCr (Tabela 4.5.).

Tabela 4.5. Występowanie wczesnych powikłań po HSCT w zależności od stwierdzonej APCr w badanej grupie (n=7; 24,1%)

Wczesne powikłania po HSCT	APCr <2	APCr 2 - 4	p
VOD (n=0)	0	0	nie badano
TAM (n=3)	3 (100%)	0	P<0,001
CLS (n=3)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	NS
FUO (n=14)	1 (7,1%)	13 (92,9%)	NS
Posocznica (n=12)	3 (25%)	9 (75%)	NS
MODS (n=2)	1 (50%)	1 (50%)	NS

APCr – oporność na aktywowane białko C,

CLS – zespół przesiąkania włósniczek,

FUO – gorączka o nieznannej etiologii,

HSCT – transplantacja macierzystych komórek krwiotwórczych,

MODS – zespół niewydolności wielonarządowej,

NS – brak znamienności statystycznej,

TAM – mikroangiopatia zakrzepowa,

VOD – zespół okluzji naczyń żylnych.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

5.1. BIAŁKO C I OPORNOŚĆ NA AKTYWOWANE BIAŁKO C

Odkąd, w 1976 roku Johan Stenflo wyizolował z osocza dotychczas nieznaną białko, nazwane potem białkiem C (PC), i którego rola przeciwzakrzepowa została potwierdzona przez Charlesa Esmona i współpracowników kilka lat później, powstało kilkadziesiąt tysięcy publikacji traktujących o PC. Obecnie wiadomo, iż PC, poza działaniem antykoagulacyjnym, posiada wielokierunkowe działanie cytoprotekcyjne, obejmujące: regulację ekspresji genów, aktywność przeciwzapalną, aktywność antyapoptotyczną oraz stabilizację endotelium [101-104].

PC u biorców komórek krwiotwórczych (HSC) stanowiło przedmiot wielu badań, aczkolwiek jego rola jest niejednoznaczna. Wątroba, komórki śródbłonna, keratynocyty, w których odbywa się produkcja PC, narażone są u biorców szpiku na działanie wielu czynników uszkodzających. Frakcjonowane napromienianie całego ciała (FTBI), megachemioterapia i globulina antytymocytarna (ATG) stosowane w ramach mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii kondycjonującej, radio- i chemioterapia powodują uszkodzenie śródbłonnków naczyń, zwłaszcza mikrokrążenia, prowadząc do wzrostu przepuszczalności tych naczyń oraz zaburzeń krążenia. Obserwowane zaburzenia krążenia pojawiają się już kilka godzin po rozpoczęciu kondycjonowania i mogą się utrzymywać jeszcze kilka miesięcy po transplantacji komórek krwiotwórczych (HSCT). FTBI oraz toksyczne metabolity leków zastosowanych w kondycjonowaniu mają również działanie hepatotoksyczne, co może prowadzić do uszkodzenia komórek śródbłonna zatok żylnych, drobnych żył wątrobowych oraz martwicy hepatocytów. Obserwowane w przebiegu aGvHD zmiany w wątrobie,

zwłaszcza w obrębie hepatocytów oraz komórek nabłonka wyściełającego międzyzrazikowe kanaliki żółciowe, mogą również mieć istotny niekorzystny wpływ na produkcję PC przez ten narząd. Ponadto uwalniane cytokiny prozapalne wskutek działań przygotowujących do HSCT mogą mieć znamienne wpływy na produkcję PC.

Pomimo licznych czynników, mogących mieć wpływ na produkcję PC u biorców HSC, nie zaobserwowano obniżenia aktywności PC poniżej wartości referencyjnych we wczesnym okresie po alloHSCT u pacjentów, u których w tym okresie nie spostrzegano jakichkolwiek powikłań. Przeciwnie, aktywność PC w dobie +5 była wyższa niż w dobie 0 i od doby +5 dalej wzrastała osiągając maksimum w dobie +39. Co więcej, od doby +5 aktywność PC była wyższa od spostrzeganej w okresie przedtransplantacyjnym. Zatem niezmienną, pozostającą w granicach wartości normalnych aktywność PC po HSCT, może świadczyć o zachowanej czynności zarówno hepatocytów, jak i endotelium, w zakresie produkcji PC u biorców allogenicznego HSC, którzy nie demonstrowali istotnych powikłań związanych z toksycznością narządową kondycjonowania, aGvHD lub powikłań infekcyjnych. Do podobnych wniosków doszli Kanamori i wsp., którzy badali parametry hemostazy, w tym aktywność PC, u 16 dorosłych biorców szpiku kostnego z chorobami rozrostowymi. Nie wykazali oni istotnych zmian aktywności PC 14 dni po HSCT ($80 \pm 7\%$) w stosunku do aktywności PC sprzed zabiegu ($96 \pm 5\%$) [105]. Podobnych spostrzeżeń dokonali Yenicesu i wsp., który nie stwierdził istotnych różnic aktywności PC u dzieci w +7 ($126 \pm 16\%$) i +14 ($122 \pm 28\%$) dobie po allo-HSCT w stosunku do okresu przedtransplantacyjnego ($116 \pm 31\%$) [106]. Pikush i wsp. natomiast poddali analizie 350 biorców allo-HSC (dzieci i dorosłych), u których zabieg wykonano zarówno z powodu chorób rozrostowych, jak i nierozrostowych. Wykazali oni, że u

pacjentów, u których nie stwierdzono żadnych powikłań w okresie potransplantacyjnym, aktywność PC po zakończeniu kondycjonowania obniżyła się osiągając wartość minimalną tydzień po HSCT. Aktywność PC wracała do wartości sprzed HSCT cztery tygodnie po zabiegu. Średnia aktywność PC w grupie pacjentów bez powikłań, pozostawała w granicach wartości referencyjnych zarówno przed, jak i po HSCT [107].

Przeprowadzono analizę wpływu następujących zmiennych na aktywność PC: typu choroby podstawowej, rodzaju HSCT w zależności od typu dawcy HSC, zastosowanego kondycjonowania, zastosowania ATG w terapii kondycjonującej, źródła komórek HSC oraz liczby przeszczepionych komórek CD34+. Aktywność PC u biorców z rozpoznaniem choroby rozrostowej była istotnie niższa w dobach: +5, +11 i +18 po HSCT w porównaniu z aktywnością PC w tym okresie u dzieci, u których HSCT wykonano z powodu choroby nierozrostowej. Dzieci z chorobami rozrostowymi, kwalifikowane do allo-HSCT, należąc do grupy najwyższego ryzyka wznowy lub demonstrując wznowę choroby, poddawane są chemioterapii konwencjonalnej o intensywnym działaniu przeciwnowotworowemu oraz o dużej toksyczności narządowej. Uszkodzenie narządów w okresie leczenia konwencjonalnego, w tym uszkodzenie wątroby, zastosowanie mieloablacyjnej terapii kondycjonującej pogłębiającej stopień niewydolności tego narządu, również w zakresie produkcji PC, może być przyczyną niższej aktywności PC po HSCT u biorców z chorobami rozrostowymi, prowadząc w konsekwencji do stanu nadkrzepliwości i zwiększonego ryzyka powikłań zakrzepowozatorowych. Harper i wsp. badając aktywność dwóch głównych antykoagulantów, tj. antytrombiny III (AT III) i PC, zwrócili uwagę na fakt, iż w okresie po HSCT, poza

obniżonym poziomem antytrombiny, spostrzega się obniżoną aktywność PC, co powoduje, że tym okresie ryzyko powikłań zakrzepowych jest zwiększone [108].

W badanej przez nas grupie wykazano również, że aktywność PC u biorców HSC kondycjonowanych przy użyciu FTBI w dobie +5 była znamienne niższa w stosunku do aktywności PC u dzieci po terapii kondycjonującej z Bu. Tymczasem w grupie badanej przez Pihusch i wsp. zastosowane kondycjonowanie mieloablacyjne, tj. z użyciem FTBI lub Bu, nie miało wpływu na aktywność PC [107]. Jednak dodanie ATG w tej grupie pacjentów znamienne obniżało aktywność PC [107]. W pracy opublikowanej przez Brandao i wsp. aktywność PC była znamienne niższa u pacjentów po FTBI [109]. ATG nie miała wpływu na aktywność PC, zarówno w badanej przez nas grupie, jak i w populacji badanej przez Inbal i wsp. [110]. Jednak przeprowadzona przez nas analiza wieloczynnikowa wykazała znamienne niższe aktywności PC w dobach +5 oraz +11 u dzieci kondycjonowanych z użyciem ATG, dla których źródłem komórek krwiotwórczych była krew obwodowa (PB). Zmniejszenie aktywności PC u pacjentów po ATG można tłumaczyć zużyciem tego antykoagulantu w przebiegu przewlekłego DIC indukowanego ATG [111].

Fakt niższych aktywności PC w dobie +5 wśród dzieci, u których przeszczepiono $\geq 3 \times 10^6/\text{kg}$ komórek CD34+ w porównaniu z dziećmi, u których podano $< 3 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ może sugerować, iż biorcy HSC z krwi obwodowej, równocześnie z wyższą dawką komórek CD34 otrzymali wyższą dawkę komórek CD3+, co w połączeniu z ATG powoduje uwalnianie szczególnie dużej ilości cytokin prozapalnych, co może w konsekwencji prowadzić do obniżenia aktywności PC. Pozostałe zmienne, tj. rodzaj HSCT w zależności od typu dawcy HSC oraz źródło komórek HSC nie miały wpływu na aktywność PC.

Ostra GvHD stanowi nadal jedno z najczęstszych powikłań HSCT. Jednym z narządów, który może być zajęty w przebiegu tej choroby jest wątroba. Objawy aGvHD wątroby spostrzega się nawet u 70% biorców HSC, u których wystąpiła aGvHD skóry i/lub przewodu pokarmowego. Izolowane zajęcie wątroby natomiast jest niezwykle rzadkie [12, 13]. W badanej grupie aGvHD wątroby (I°) wystąpiło u 1 pacjenta i towarzyszyło aGvHD skóry (II°). W związku z tym nie analizowano aktywności PC u pacjentów z aGvHD w zależności od narządu zajętego procesem chorobowym. Natomiast poddano analizie porównawczej aktywność PC w dwóch grupach pacjentów: aGvHD (0-I°) vs. aGvHD (II°-III°). Nie wykazano istotnych różnic statystycznych w aktywnościach PC w tych grupach. Natomiast Pihusch i wsp. [107] zaobserwował, iż aktywność PC jest tym niższa im wyższy stopień kliniczny aGvHD, jednak bez związku z zajęтым narządem docelowym aGvHD.

Biorcy HSC są szczególnie narażeni na zagrażające życiu powikłania mieloablacyjnego kondycjonowania, u podstaw których leży uszkodzenie śródbłonka naczyń krwionośnych z następową aktywacją procesów krzepnięcia. Występowaniu opisanych zaburzeń u biorców HSC sprzyja szczególne narażenie śródbłonka naczyniowego na często równoczesne działanie kilku czynników uszkadzających, w tym cytostatyków użytych w kondycjonowaniu, promieniowania jonizującego (FTBI), leków stosowanych w profilaktyce GvHD (cyklosporyna A, takrolimus) oraz wysokich stężeń cytokin prozapalnych uwalnianych w związku z kondycjonowaniem, zakażeniem i/lub GvHD. Klinicznie opisany proces uszkodzenia śródbłonek może przebiegać pod postacią VOD, TAM, CLS i innych wczesnych powikłań [19, 112]. W analizowanej przez nas grupie, wczesne powikłania związane z uszkodzeniem komórek śródbłonka wystąpiły u 6 pacjentów, z czego u 3 dzieci rozpoznano TAM, a u kolejnych 3 dzieci

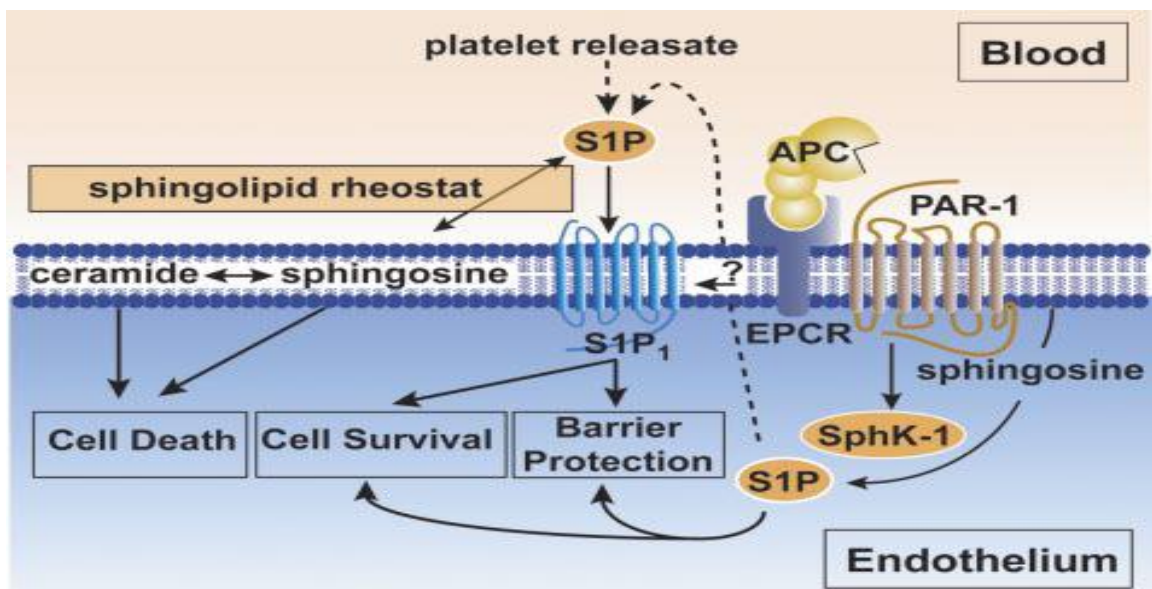
CLS. W badanej grupie nie stwierdzono VOD, być może dzięki postępowaniu zapobiegawczemu prowadzonemu u wszystkich dzieci, u których zastosowano kondycjonowanie mieloablacyjne. W przeprowadzonej analizie wykazana została znamienne niższa aktywność PC w dobie +5 u biorców HSC z wczesnymi powikłaniami (CLS, TAM) w porównaniu z grupą kontrolną. Średnia aktywność PC w dniu wystąpienia powikłania była statystycznie istotnie niższa ($77,4 \pm 40,8\%$) w porównaniu do dnia poprawy klinicznej ($122,8 \pm 42,9\%$). Podobne wyniki uzyskali Pihusch i wsp. [107], tj. aktywność PC u pacjentów z TAM wynosiła 68,6%, a u pacjentów bez powikłań 96,3%.

Ze względu na brak chorych z VOD, nie dokonano oznaczeń aktywności PC w tej grupie pacjentów. Jednak z piśmiennictwa wynika, że w przebiegu VOD spostrzega się obniżoną aktywność PC [113, 114]. Aktywność PC poniżej 34,5% jest czynnikiem predykcijnym VOD (czułość 100% oraz swoistość 83,3%). Co więcej aktywność PC poniżej 34,5% wyprzedza pojawienie się objawów klinicznych VOD, a powrót aktywności PC do wartości normalnych wyprzedza ustąpienie tych objawów [114]. Podobnie jak PC, także inne czynniki, takie jak: AT III, PS, TM, vWF, inhibitor t-PA, aminopropeptydaza typu III, prokolagen III, były badane pod kątem pełnienia roli czynników predykcyjnych i prognostycznych VOD, jednak ich rola w tym zakresie nie została jednoznacznie i ostatecznie określona [115-119].

Spadek aktywności PC w przebiegu powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonnków jest najprawdopodobniej wypadkową wielu różnych mechanizmów. Po pierwsze konsekwencją uszkodzenia śródbłonnków jest aktywacja układu krzepnięcia, a spadek aktywności PC wynika z jego zużycia (koagulopatia ze zużycia). Poza tym przemieszczeniu płynów z przestrzeni wewnątrz – do pozanaczyniowej, w przebiegu

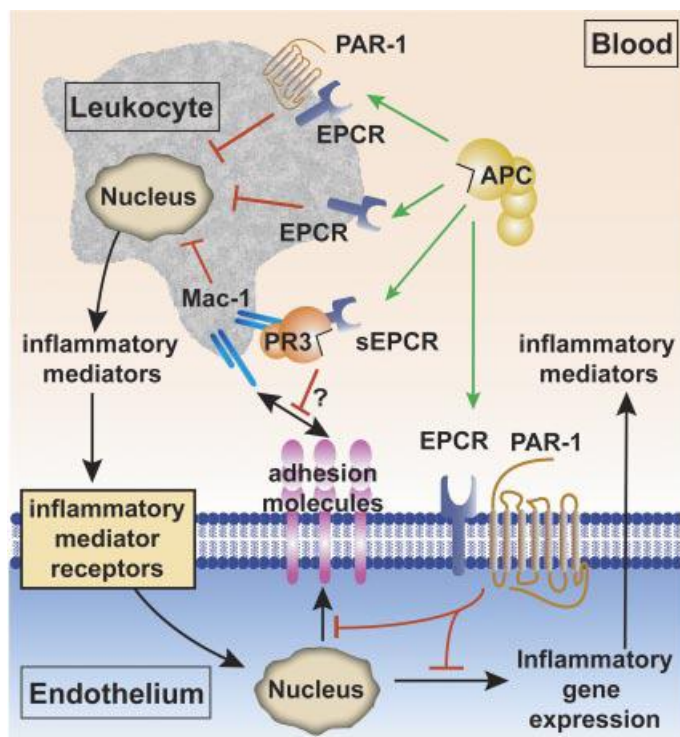
powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłoków (VOD, CLS), może towarzyszyć przemieszczenie białka C [107].

Jak już wspomniano PC ma działanie cytoprotekcyjne: reguluje ekspresję genów, działa przeciwzapalnie, antyapoptotycznie oraz stabilizuje śródbłoki. Stabilizacja śródbłoków przez PC odbywa się na drodze EPCR-zależnej aktywacji receptora aktywowanego przez proteazę 1 (ang. *protease activated receptor-1*, PAR-1). Aktywowany PAR-1 za pośrednictwem białka G_i jest odpowiedzialny za aktywację kinazy sfingozyny 1, która przekształca sfingozynę 1 w fosforan sfingozyny 1. Ten natomiast za pośrednictwem swojego receptora stabilizuje cytoszkielet na drodze zależnej od kinazy aktywowanej mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPKs). PAR-1 stanowi również receptor dla trombiny. Połączenie trombiny z PAR-1 prowadzi do destabilizacji śródbłoków – Ryc. 5.1.a. [101-104].



Ryc. 5.1.a. Mechanizm stabilizacji endotelium przy udziale białka C (Laurent OM, Berislav VZ, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109: 3161-3172)

Udział PC w powikłaniach infekcyjnych jest bezsprzeczny. Działanie przeciwzapalne PC, odbywa się zarówno przy udziale komórek śródbłonna, jak i leukocytów. Połączenie PC z jego receptorem EPCR, z następową aktywacją PAR-1 na endothelium w mechanizmie „*down regulation*” zmniejsza ekspresję genów czynników zapalnych (między innymi interleukiny 1) oraz zmniejsza ekspresję cząsteczek adhezyjnych (*ang. intracellular adhesion molecule*, ICAM-1, *ang. vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1 i E-selektyny) na powierzchni śródbłonna, redukując możliwość adhezji leukocytów i infiltracji tkanek przez leukocyty. Efekt przeciwzapalny PC, który odbywa się za pośrednictwem leukocytów jest niejasny. PC łącząc się z EPCR na powierzchni monocytów, komórek NK, neutrofilii oraz eozynofili zmniejsza wydzielanie cytokin prozapalnych (IL-1, TNF α). Poza tym PC po połączeniu z kompleksem utworzonym przez rozpuszczalny EPCR – proteinazę 3 – CD11b/CD18 na leukocytach może regulować wydzielanie cytokin prozapalnych oraz adhezję leukocytów do komórek śródbłonna – Ryc. 5.1.b. [101-104].



Ryc. 5.1.b. Udział białka C w procesach przeciwzapalnych (Laurent OM, Berislav VZ, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. Blood 2007; 109: 3161-3172)

Obserwacja pacjentów dorosłych w neutropenii z rozwiniętą posocznicą wskazuje na spadek aktywności PC, już nawet 12-24 godziny przed rozwinięciem objawów posocznicy lub wstrząsu septycznego. Aktywność PC poniżej wartości referencyjnych może stanowić niekorzystny czynnik rokowniczy. Co więcej ocena aktywności PC podczas pierwszego epizodu gorączki neutropenicznej może wyodrębnić pacjentów wysokiego ryzyka rozwoju posocznicy oraz wstrząsu septycznego. Stwierdzono, iż wśród pacjentów z rozwiniętym wstrząsem septycznym średnia aktywność PC jest niższa i utrzymuje się poniżej normy przez dłuższy okres w porównaniu z aktywnością PC u pacjentów z posocznicą [120]. Dane w literaturze na temat aktywności PC wśród dzieci z gorączką neutropeniczną są skąpe. Przedstawione przez Kassam A i wsp; wyniki analizy 73 pacjentów z gorączką neutropeniczną, (spośród których u 10 potwierdzono bakteriemię) sugerują, iż aktywność PC w czasie

gorączki neutropenicznej nie różni się wśród dzieci bez i z bakterią [121]. W badanej przez nas grupie aktywność PC w pierwszej dobie posocznicy, była znacząco niższa w porównaniu z aktywnością PC w pierwszym dniu FUO i była poniżej wartości referencyjnych. Po ustąpieniu objawów klinicznych FUO i posocznicy aktywność PC nie tylko wracała do wartości wyjściowych, ale w kolejnych dniach obserwacji była znacząco wyższa od aktywności PC spostrzeganej w pierwszej dobie tych powikłań. Analiza profili aktywności PC wykazała, iż po zakończeniu mieloablacyjnej terapii kondycjonującej, w dniu zabiegu allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych aktywność PC była istotnie niższa wśród dzieci, u których wystąpiła posocznica w okresie potransplantacyjnym. Aktywność PC wśród dzieci z posocnicą począwszy od doby 0 utrzymywała się poniżej wartości referencyjnych i wróciła do normy dopiero w dobie +18. Natomiast aktywność PC u pacjentów z FUO pozostawała przez cały okres okołotransplantacyjny w granicach normy.

Podobnie jak w powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonnków, tak i w powikłaniach infekcyjnych, które w konsekwencji mogą prowadzić do uszkodzenia endotelium, spadek aktywności PC w przebiegu tych powikłań jest wypadkową wielu mechanizmów. Jednym z nich jest zwiększenie „konsumpcji” PC po stymulacji przez kompleks trombina-trombomodulina w odpowiedzi na generowany przez cytokiny prozapalny stan nadkrzepliwości. Połączenie PC ze swoim receptorem EPCR może być również przyczyną obserwowanej w przebiegu powikłań infekcyjnych obniżonej aktywności PC w osoczu. W przypadku dołączenia się objawów niewydolności wątroby, obniżona produkcja PC przez wątrobę może sprzyjać nabytemu niedoborowi PC [120].

W związku z tym, że MODS stwierdzono tylko u 2 dzieci, nie przeprowadzono analizy statystycznej w tej grupie pacjentów. Aktywność PC w chwili rozpoznania MODS wynosiła 49% u jednego i 34,2% u drugiego dziecka, i uległa obniżeniu w dniu pogorszenia stanu klinicznego obu pacjentów i wynosiła odpowiednio 25,8% i 22,8%.

Badania nad aktywnością białka C u pacjentów po allo-HSCT z rozwiniętym MODS przeprowadzone przez innych autorów wykazały wyraźny spadek aktywności tego białka w osoczu, z przyczyn podobnych do tych, które zostały omówione przeze mnie wcześniej. Obniżona aktywność PC ($\leq 40\%$) pogarszała przebieg MODS i była złym czynnikiem rokowniczym. Ryzyko rozwoju MODS i zgonu było tym większe, im niższa aktywność PC w okresie przedtransplantacyjnym [122, 123].

Wprowadzenie do leczenia rekombinowanego aktywowanego białka C (Xigris, Eli Lilly) rozpoczęło nową erę leczenia pacjentów z posocznicą oraz wstrząsem septycznym. PROWESS (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) stanowiące wieloośrodkowe badanie, do którego włączono 2280 dorosłych pacjentów, potwierdziło redukcję śmiertelności w grupie pacjentów z posocznicą o wysokim ryzyku zgonu (25 punktów i więcej zgodnie ze skalą Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, APACHE II) o 6,1% w stosunku do pacjentów otrzymujących placebo (30,8% vs. 24,7%, $p=0,005$) [123]. W kolejnym badaniu ADDRESS (Administration of Drotrecogin Alfa (activated) in Early Stage Severe Sepsis), w którym poddano analizie 2640 pacjentów, śmiertelność w grupie otrzymującej lek była porównywalna do grupy otrzymującej placebo (18,5% vs 17%, $p=ns$). Uwzględniając pacjentów z najwyższym ryzykiem zgonu (APACHE II powyżej 25 punktów) nie wykazano redukcji śmiertelności u pacjentów otrzymujących drotrecogin alfa,

aczkolwiek grupa badana była mniej liczna niż w PROWESS i składała się tylko z 321 pacjentów [124]. Chorzy pediatryczni zostali poddani analizie w badaniu RESOLVE (Researching Severe Sepsis and Organ Dysfunction in Children: A Global Perspective). Badanie obejmowało 477 pacjentów i zostało zakończone przed czasem, ze względu na nieistotną redukcję śmiertelności w grupie otrzymującej białko C w porównaniu z grupą placebo (17,5% vs. 17,2%, p=ns) i zwiększone ryzyko krwawień do ośrodkowego układu nerwowego (4,6% vs. 2,1%, p=ns) [125]. Ze względu na brak dowodów występowania korzyści z zastosowania białka C u pacjentów z posocznicą, Europejska Agencja Leków rozpoczęła kolejne badanie PROWESS-SHOCK, którego wyniki zostaną przedstawione w sierpniu 2011 roku [126]. Inne badanie APROCCHS (Activated Protein C and Corticosteroids for Human Septic Shock), w którym zostanie oceniona skuteczność leczenia pacjentów białkiem C w połączeniu z małymi dawkami sterydów, jest również w trakcie realizacji [127]. W badaniu XPRESS (Xigris and Prophylactic Heparin Evaluation in Severe Sepsis) wykazano natomiast redukcję śmiertelności u pacjentów leczonych rekombinowanym białkiem C w połączeniu z heparyną w stosunku do chorych leczonych samym białkiem C (26,9% vs. 35,6%, p=0,005) [128].

Należy wspomnieć, iż bezpieczeństwo i skuteczność rekombinowanego białka C (drotrecoginu alfa) była oceniana również w grupie pacjentów po allo-HSCT. Pacjenci poddani allo-HSCT zostali wykluczeni z powyżej wspomnianych badań, przede wszystkim ze względu na zwiększone ryzyko krwawień związane z trombocytopenią oraz wysokie ryzyko zgonu w pierwszych 28 dniach po allo-HSCT z innych powodów niż infekcje. Wyniki bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania drotrecoginu alfa przedstawił Pastores SM i wsp. [129]. Pierwotnie zakładano, iż do badania zostanie włączonych 250 pacjentów z 20 ośrodków transplantacyjnych od

marca 2003 roku do marca 2005 roku. Z analizy wyłączono: pacjentów poniżej 18 roku życia, pacjentów którzy byli 60 dni lub więcej po allo-HSCT, pacjentów należących do grupy wysokiego ryzyka krwawień, w tym pacjentów wymagających przetoczeń koncentratu krwinek płytkowych. Badanie przerwano jednak już po 10 miesiącach, przede wszystkim ze względu na restrykcyjne kryteria włączenia pacjentów i w związku z tym trudności z zakwalifikowaniem 250 pacjentów do badania. W okresie 10 miesięcy do badania włączono 7 pacjentów, z których 2 zginęło z powodu posocznicy, a 2 zginęło z powodu ciężkich powikłań krwotocznych [129]. Sukcesem natomiast została zakończona terapia VOD koncentratem białka C (Ceprotin), u 6 dzieci po allo-HSCT [60].

PC jako jeden z czynników antykoagulacyjnych ma za zadanie, jak już wspomniano, inaktywować czynnik V. Defekt polegający na zastąpieniu argininy w pozycji 506 łańcucha ciężkiego czynnika V glutaminą (mutacja Leiden) jest przyczyną występowania oporności czynnika V na proteolityczne działanie aktywnego PC i zachowania przez czynnik V aktywności prokoagulacyjnej. Około 10% przypadków ze stwierdzoną APCr, nie jest nosicielami mutacji genu czynnika V Leiden, tylko innego defektu: mutacji genu protrombiny, czynnika V Cambridge, Liverpool i innego. APCr stanowi główny czynnik ryzyka powikłań zakrzepowo-zatorowych [56, 57].

Wśród dorosłych pacjentów z chorobą nowotworową, taką jak: chłoniaki, rak płuc, rak piersi, raki przewodu pokarmowego, APCr jest obserwowana wśród 10% do 37% chorych, co w porównaniu z populacją osób zdrowych, świadczy o częstszym jej występowaniu w grupie dorosłych pacjentów onkologicznych [130-134]. Częstość występowania mutacji Leiden natomiast jest porównywalna w obu tych grupach pacjentów [131, 135]. APCr wśród pacjentów onkologicznych to najczęściej postać

nabyta, która może wynikać między innymi z interferowania produktów komórek nowotworowych lub produktów innych komórek wytwarzanych w odpowiedzi na proces rozrostowy ze składowymi układami białka C. APCr może być również wtórna do niskiego stężenia PS, wysokich poziomów czynnika V, VIII i fibrynogenu. Udział PS w patogenezie nabytej APCr jest dyskusyjny. Nadekspresja receptora dla PS (C4bP) na niektórych liniach komórek nowotworowych, między innymi na mieloblastach, może skutkować zwiększonym wychwytem PS przez C4b, co zmniejsza stężenie wolnego PS i aktywność PS jako kofaktora reakcji aktywacji PC i proteolizy PC. APCr może również wynikać z obecności przeciwciał kardiolipinowych i antyfosfolipidowych wśród pacjentów onkologicznych, a zwłaszcza z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego. APCr wraca do wartości normalnych u pacjentów, którzy odpowiedzieli na leczenie onkologiczne. Nabyta postać APCr również zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych [136,137]. Wrodzone postaci APCr (mutacja genu czynnika V Leiden, mutacja genu protrombiny) zostały uznane za istotny czynnik ryzyka powikłań zakrzepowo-zatorowych u dzieci z ALL leczonych preparatami L-asparaginazy [138-140].

Rola wrodzonych trombofilii w powikłaniach zakrzepowo-zatorowych po allo-HSCT jest niejasna. Przedstawione przez Duggan i wsp; wyniki analizy 22 pacjentów z VOD i 51 bez VOD sugerowały istotną rolę mutacji genu protrombiny, a nie mutacji genu czynnika V Leiden w patogenezie VOD [141]. Opublikowane przez Ertem i wsp. wyniki wskazywały natomiast na istotną rolę mutacji Leiden w rozwoju VOD u pacjentów po allo-HSCT [142]. Pihusch i wsp. przedstawił wyniki analizy wpływu następujących wrodzonych zaburzeń genetycznych (mutacja genu czynnika V G1691A, mutacja genu protrombiny G20210A, mutacja genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej C677T, polimorfizm PLA1/PLA2 genu glikoproteiny

IIIa, polimorfizm genu łańcucha β fibrynogenu 455G/A, polimorfizm genu PAI-1 – 675 4G/5G, polimorfizm intronu 16I/D enzymu konwertującego angiotensynę) u 89 biorców allo-HSCT, które mogłyby mieć wpływ na występowanie powikłań zakrzepowo-zatorowych w okresie potransplantacyjnym. Potwierdzono, iż tylko polimorfizm genu PAI-1 – 675 4G/5G może stanowić czynnik ryzyka VOD. Pozostałe wrodzone trombofilie nie miały wpływu na rozwój powikłań zakrzepowo-zatorowych po allo-HSCT [143].

APCr w naszym badaniu była analizowana pod kątem udziału tej patologii w etiopatogenezie wczesnych powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonek. APCr w badanej grupie stwierdzono u 7 dzieci. U każdego pacjenta potwierdzono mutację genu czynnika V Leiden. Należy podkreślić, że u wszystkich pacjentów w badanej grupie potwierdzono remisję choroby rozrostowej przed allo-HSCT, a nabyta APCr związana z chorobą nowotworową jest opisywana w piśmiennictwie przede wszystkim na początku leczenia. Co więcej stężenie wolnego PS przed allo-HSCT u każdego pacjenta z APCr było w granicach wartości referencyjnych (średnia $79,6 \pm 22,1\%$), w związku z tym nie można tłumaczyć stwierdzonej APCr obniżonym stężeniem wolnego PS. Z przedstawionych przez nas podczas 7th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases Working Party w czerwcu 2010 roku w Helsinkach wstępnych analiz wynikało, iż APCr związana z mutacją genu czynnika V Leiden może odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie TAM. Wówczas grupę badaną stanowiło 21 pacjentów, wśród których stwierdzono 4 pacjentów z APCr. U 3 z nich zdiagnozowano TAM (streszczenie doniesienia jest dostępne na str. 196). W zaprezentowanej w pracy doktorskiej grupie 7 pacjentów z APCr, TAM rozpoznano u 3 dzieci. Należy podkreślić, że przedstawione wyniki mają charakter wstępny, natomiast wnioski wskazujące na APCr jako ważny

czynnik ryzyka rozwoju TAM nie były dotychczas przez nikogo sformułowane i wymagają poparcia dalszymi badaniami.

5.2. BIAŁKO S

Białko S podobnie jak PC produkowane jest przez wątrobę. Narażenie biorców komórek krwiotwórczych na szereg czynników o potencjalnym działaniu hepatotoksycznym, między innymi: FTBI, cytostatyki i ich metabolity użyte w kondycjonowaniu oraz inne leki stosowane w postępowaniu wspomagającym po allo-HSCT, a także zakażenia, aGvHD mogłyby sugerować istotny spadek stężenia wolnego PS u pacjentów po allo-HSCT. Z obserwacji dokonanych w grupie kontrolnej wynika, iż nie istnieją istotne różnice średnich stężeń wolnego PS we wczesnym okresie potransplantacyjnym w stosunku do średniego stężenia wolnego PS spostrzeganego przed HSCT. Średnie stężenie wolnego PS począwszy od doby 0 do doby +39 po zabiegu systematycznie wzrastało, jednak bez znamienności statystycznej. Natomiast w badanej grupie dzieci z powikłaniami allo-HSCT w dniu transplantacji wprowadzie spostrzegano statystycznie nieistotne, ale jednak obniżenie stężenia wolnego PS, które utrzymywało się aż do doby +11, po czym stężenie PS zaczęło wzrastać osiągając najwyższą wartość w dobie +53. Należy jednak podkreślić, że stężenie wolnego PS w obydwu badanych grupach pozostawało w granicach wartości normalnych przez cały okres obserwacji. Wydaje się zatem prawdopodobne, że niższe stężenie wolnego PS w badanej grupie dzieci bezpośrednio po zakończeniu mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii kondycjonującej w stosunku do czasu przed allo-HSCT mogło być związane, podobnie jak w przypadku aktywności PC, z przejściowym upośledzeniem czynności wątroby. Jednak należy zauważyć, że po allo-HSCT aktywność PC u pacjentów z powikłanym okresem potransplantacyjnym spadła poniżej wartości referencyjnych.

Mogłoby to wskazywać, że istotną rolę w spadku aktywności PC u pacjentów z powikłaniami odgrywa nie tylko uszkodzenie wątroby, ale także uszkodzenie pozostałych źródeł PC, przede wszystkim komórek śródbłonka. W piśmiennictwie można znaleźć dane mówiące zarówno o znamienym obniżeniu się stężenia wolnego PS po allo-HSCT [108], jak i braku różnic w jego stężeniu porównując okres przed- i potransplantacyjny [105, 106].

Podobnie jak w przypadku PC, stężenie wolnego PS było niższe w dobie +5 oraz + 11 u biorców HSC z rozpoznaniem choroby rozrostowej. Najprawdopodobniej można to tłumaczyć tym, iż pacjenci z chorobą nowotworową poddani byli wcześniej intensywnej chemioterapii oraz kondycjonowaniu mieloablacyjnemu o działaniu hepatotoksycznym (między innymi: wysokimi dawkami metotreksatu w ALL, cytarabiny w AML), co nie pozostaje bez wpływu na produkcję czynników krzepnięcia przez ten narząd. Poza tym uszkodzenie śluzówki przewodu pokarmowego towarzyszące leczeniu chemio- i radioterapią, może upośledzać wchłanianie witaminy K, która jest niezbędna do produkcji PS i PC. W piśmiennictwie wspomina się także, że niedobór witaminy K towarzyszy pacjentom kondycjonowanym busulfanem, ale u których w profilaktyce przeciwdrgawkowej podczas podawania tego cytostatyku zastosowano fenytoinę (antagonista witaminy K) [144]. Należy wspomnieć, iż w Dziecięcym Oddziale Transplantacji Szpiku Kostnego w Poznaniu w profilaktyce przeciwdrgawkowej w trakcie kondycjonowania z Bu stosuje się klonazepam, który nie ma wpływu na stężenie PS. Stężenie wolnego PS u biorców MSD-HSC w porównaniu ze stężeniem u biorców MUD-HSC było niższe w dobie +5 oraz +11. Nie ma to związku ze źródłem komórek, bowiem porównując stężenie wolnego PS u pacjentów po MSD-HSCT i po MUD-HSCT, uwzględniając to samo źródło komórek, potwierdzono, iż jest ono niższe wśród biorców MSD-HSC. Inbal i wsp. oraz Harper i wsp. nie

wykazali różnic stężeń wolnego PS pomiędzy biorcami MSD-HSC a MUD-HSC [105, 108]. W analizowanej przez nas grupie wykazano również, że zastosowanie ATG skutkuje wyższymi stężeniami wolnego PS w +5 dobie po przeszczepieniu. Co więcej stężenie to było znamienne wyższe u pacjentów kondycjonowanych z ATG, ale dla których źródłem komórek był szpik kostny. Spostrzeżenie to nie ma potwierdzenia w piśmiennictwie. W pracy przedstawionej przez Inbal i wsp. nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stężeniem wolnego PS w dniu transplantacji u pacjentów przygotowywanych do allo-HSCT z i bez ATG ($115,1 \pm 23,8\%$ vs $99,9 \pm 31,8\%$) [110]. Mogłoby się wydawać, iż u pacjentów, u których zastosowano ATG, stężenie wolnego PS obniży się w stosunku do okresu przedtransplantacyjnego, przede wszystkim z powodu zużycia w przebiegu DIC. W związku z tym nasuwa się pytanie dlaczego w badanej przez nas grupie biorców kondycjonowanych z użyciem ATG obserwowano wyższe stężenie wolnego PS we wczesnym okresie po allo-HSCT? Odpowiedzi na to pytanie nie znaleźliśmy. Podobnie jak trudno wytłumaczyć fakt wyższych stężeń wolnego PS u biorców BM w porównaniu do biorców PBSC, u których w przygotowaniu do allo-HSCT zastosowano ATG. Nie wykazano różnic stężeń wolnego PS u dzieci z chorobami rozrostowymi, które kondycjonowano z i bez ATG. Rodzaj kondycjonowania (FTBI, Bu, Trs) oraz liczba przeszczepionych komórek CD34+ nie miała wpływu na stężenie wolnego PS po allo-HSCT.

Stężenia wolnego PS zarówno w okresie przed- jak i potransplantacyjnym nie różniły się pomiędzy dziećmi ze rozpoznaną aGvHD (0-I°) a aGvHD (II°-III°). Podobne wnioski zostały sformułowane przez Kanamoriego i wsp; którzy poddali analizie różnicowej stężenia wolnego PS w 14 dobie po allo-HSCT u dorosłych pacjentów z aGvHD 0-I° ($80 \pm 4\%$) i aGvHD II°-IV° ($68 \pm 7\%$) [105].

W badaniach własnych u biorców HSC demonstrujących powikłania allo-HSCT związane z uszkodzeniem śródbłonnków (CLS, TAM) stwierdzono znamienne niższe stężenie wolnego PS w dobie +11 w porównaniu z dziećmi bez tych powikłań. Stężenie wolnego PS w dniu rozpoznania CLS lub TAM było znamienne niższe ($53,8 \pm 20,4\%$) w stosunku do stężenia spostrzeganego w dniu, w którym odnotowano ustępowanie objawów i poprawę stanu klinicznego ($91,6 \pm 24,6\%$) ($p=0,015$). Kanamori i wsp. nie wykazali natomiast różnic stężeń wolnego PS u pacjentów z ($68 \pm 11\%$) i bez ($76 \pm 4\%$) TAM w 14 dobie po przeszczepieniu [105]. W badaniu opublikowanym przez Lee i wsp. obserwowano spadek stężenia całkowitego PS wśród pacjentów z VOD w 14 dobie po HSCT. Stężenie wolnego PS uległo istotnemu obniżeniu w stosunku do grupy kontrolnej w 21 dniu po przeszczepieniu [145]. W związku z tym, że PS w odróżnieniu od PC, nie pełni roli cytoprotekcyjnej, stabilizującej śródbłonnki, udział PS najprawdopodobniej w patogenezie powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonnków jest mniejszy. Spadek stężenia wolnego PS w przebiegu tych powikłań należy najprawdopodobniej tłumaczyć jego zużyciem w procesie aktywowania PC. Możliwe jest również przemieszczenie PS z krwi do przestrzeni pozanaczyniowej przez uszkodzone endothelium.

W badaniach na zwierzętach zauważono, że połączenie PS z jego receptorem C4bP skutkuje nadwrażliwością zwierząt na czynniki zakaźne (*E.coli*). Kompleks PS-C4bP jest nieaktywny w zakresie przekształcania PC z postaci nieaktywnej do aktywowanej. Konsekwencją infuzji *E.coli* z jednoczasową inaktywacją PS przez połączenie z C4bP było podwyższone stężenie TNF α i koagulopatia ze zużycia [146]. Zjawisko to świadczy o istotnej roli, jaką PS odgrywa w powikłaniach infekcyjnych. W badanej grupie nie wykazano różnic stężeń wolnego PS w pierwszej dobie FUO w

porównaniu ze stężeniem wolnego PS w pierwszej dobie posocznicy. W związku z tym stężenie wolnego PS nie może stanowić markeru różnicującego FUO z posocnicą we wczesnym okresie tych powikłań. Stężenie wolnego PS znamienne wzrastało po zakończeniu leczenia posocznicy w stosunku do czasu przed włączeniem leczenia. Obserwacje natomiast pacjentów z FUO nie pozwalają wyciągnąć podobnych wniosków.

Obserwowany spadek stężenia wolnego PS jest konsekwencją wzrostu poziomu C4bP w przebiegu powikłań infekcyjnych i w związku z tym zwiększonym wychwytem PS przez C4bP, a także inaktywacją PS przez proteazy produkowane przez neutrofile [103].

Stężenie wolnego PS w chwili rozpoznania MODS wynosiła 56,7% u jednego i 44,6% u drugiego dziecka, i uległa obniżeniu w dniu pogorszenia stanu klinicznego obu pacjentów i wynosiła odpowiednio 32,7% i 27,8%. Spadek stężenia wolnego PS w przebiegu MODS to wypadkowa wielu mechanizmów: zmniejszonej produkcji przez wątrobę, zwiększonej produkcji C4bP i zwiększonego wychwytu PS przez składową dopełniacza, inaktywacji PS przez proteazy oraz zużywania PS w procesie aktywowania PC. Możliwe jest również przemieszczenie PS z krwi do przestrzeni pozanaczyniowej przez uszkodzone śródbłonki [103, 122, 146].

5.3. Trombomodulina

Śródbłonek może być postrzegany jako największy gruczoł endokryny w ustroju człowieka. W organizmie dorosłego człowieka występuje około 1×10^{12} komórek śródbłonek, których powierzchnia wynosi ogółem około 400 m^2 . Komórki śródbłonek

stanowią barierę między krwią i mięśniami gładkimi naczyń i są odpowiedzialne za syntezę i uwalnianie wielu substancji regulujących wazomotorykę, hemostazę, angiogenezę, procesy zapalne i immunologiczne. Uszkodzenie zaburza równowagę zapewnianą przez te komórki, powodując rozwój wielu zmian patologicznych [147].

TM, o której mowa stanowi integralną glikoproteinę komórek śródbłonka. Pod wpływem wielu różnych czynników uszkadzających endotelium, domena zewnątrzkomórkowa TM zostaje odłączona od domeny transbłonowej. Powstaje w ten sposób sTM, która może świadczyć o uszkodzeniu komórek śródbłonka. Szereg białek, w tym TM, vWF, E-selektyna i wiele innych były i są przedmiotem badań jako markery uszkodzenia endotelium w przebiegu różnych procesów patologicznych [147].

Obserwacje prowadzone przez Kanamori i wsp; Luzzato i wsp. wskazują na wzrost stężenia TM po allo-HSCT w stosunku do stężenia TM spostrzeganego przed rozpoczęciem kondycjonowania [105, 148]. W innych badaniach natomiast nie potwierdzono wzrostu stężenia TM w okresie potransplantacyjnym, również w grupie z powikłanym okresem potransplantacyjnym [149, 150]. W badanej przez nas grupie kontrolnej stwierdzono nieznamienne różnice stężeń sTM w kolejnych punktach czasowych po allo-HSCT w porównaniu do stężenia sTM przed rozpoczęciem kondycjonowania. Natomiast w grupie pacjentów z powikłaniami allo-HSCT obserwowano znamienne spadki stężenia sTM w dobach +5 oraz +11 w stosunku do czasu przed allo-HSCT. Wyniki badań Richarda i wsp. oraz Parka i wsp. wskazują na brak istotnego wpływu HSCT na stężenia TM [149, 150].

Nie wykazano związku pomiędzy stężeniem sTM a typem choroby podstawowej, rodzajem HSCT w zależności od typu dawcy HSC, zastosowanym kondycjonowaniem, zastosowaniem ATG w kondycjonowaniu, źródłem komórek HSC oraz liczbą przeszczepionych komórek CD34+.

Wpływ aGvHD na stężenie TM jest również niejasny. Przeprowadzone analizy przez Salat i wsp. wykazały znamiennej wzrost stężenia TM w stosunku do spostrzeganego przed rozpoczęciem mieloablacyjno-immunosupresyjnej terapii przygotowującej u pacjentów z aGvHD. Stężenie było tym wyższe im wyższy stopień aGvHD [151]. Podobnie w badaniach Testa i wsp. stężenie TM wrosło znamiennej u pacjentów z aGvHD [152]. Kanamori i wsp. natomiast nie wykazali różnic statystycznych pomiędzy pacjentami z aGvHD (0-I°) a pacjentami z aGvHD (II°-IV°) [105]. W analizowanej przez nas grupie stężenie sTM w poszczególnych punktach czasowych było niższe u dzieci z aGvHD (0-I°) w porównaniu ze stężeniem sTM u dzieci z aGvHD (II°-IV°), jednak nie były to istotne różnice statystyczne.

Jak już wspomniano, TM i inne białka były analizowane pod kątem pełnienia roli jako markery uszkodzenia komórek śródbłonna. Żadna z dotychczas rozpatrywanych substancji nie została uznana za idealny marker uszkodzenia tych komórek. Nie znaleziono również dotychczas żadnej substancji, której odchylenia w stężeniu w okresie przedtransplantacyjnym przewidywałyby wystąpienie po allo-HSCT wczesnych powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonna.

Stężenie sTM w badanej grupie nie różniło się statystycznie w poszczególnych punktach czasowych w grupie pacjentów z CLS i TAM versus bez tych powikłań. Co więcej nie wykazano różnic statystycznych pomiędzy stężeniem w pierwszym dniu wspomnianych powikłań ($3,2 \pm 3,1$ ng/ml) a dniem poprawy klinicznej ($2,8 \pm 3,6$ ng/ml). W pracy przedstawionej przez Kanamori i wsp. stężenie TM było znamiennej wyższe u pacjentów z TAM w porównaniu ze stężeniem TM u osób bez tych powikłań [105]. Stężenie wrosło znamiennej również wśród pacjentów z CLS [153] i VOD [152, 153]. Catani i wsp. nie potwierdzili wzrostu stężenia TM w przebiegu VOD [154].

Wynikałoby z tego, że rola TM w powikłaniach związanych z uszkodzeniem śródbłonnków jest niejasna, a poziomy TM są chimeryczne. W przedstawionych analizach stężenia TM wzrastają w przebiegu wczesnych powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonnków lub nie zmieniają się. W piśmiennictwie wskazuje się, że poziomy TM zależą od wielu czynników, między innymi od funkcji nerek, bowiem TM obecna surowicy wydalana jest głównie drogą nerek i każde zaburzenie ich czynności prowadzi do zwiększenia stężenia TM w surowicy krwi oraz od upośledzonej funkcji wątroby, która podobnie jak stosowanie heparyny może podwyższać stężenie TM [155]. Należy zauważyć, że w Dziecięcym Oddziale Transplantacji Szpiku Kostnego w Poznaniu heparyna jest rutynowo stosowana w profilaktyce VOD w dawce 100 U/kg/dobę.

O udziale TM w patogenezie wczesnych powikłań po allo-HSCT związanych z uszkodzeniem śródbłonnków może świadczyć stabilizacyjny wpływ wywierany przez TM na mikrokrążenie na drodze aktywacji prokarboksypeptydazy B, zwanej również inhibitorem fibrynolizy aktywowanej przez trombinę (*ang. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI). TAFI inaktywuje składnik układu dopełniacza C5a. C5a jest anafilatoksyną, która stymuluje uwalnianie histaminy przez mastocyty. C5a jest również chemoatraktantem dla leukocytów. C5a uczestniczy w uszkodzeniu mikrokrążenia, prowadząc do przesiąkania włóscinek [103].

TM wywiera działanie przeciwzapalne hamując ekspresję genów cytokin prozapalnych (interleukiny 1 i 6) oraz TNF α . Odwrotnie, cytokiny prozapalne w mechanizmie „*down regulation*” wpływają na aktywność TM. Czynniki zakaźne, aktywowane neutrofile, produkowana przez nie elastaza, odłączają frakcję zewnątrzłonową TM, tworząc dużo mniej aktywną postać sTM. Poza tym rodniki

tlenowe uwalniane przez neutrofile na drodze oksydacji metioniny w obrębie TM, zmniejszają jej aktywność w zakresie aktywacji PC [103, 104]. Domena lektynopodobna TM warunkuje odpowiedź endotelium na mediatory procesu zapalnego oraz chroni komórki śródbłonka przed infiltracją przez leukocyty [156]. Co więcej domena ta neutralizuje białko wysokiej mobilności B1 (*ang. high mobility group box 1 protein, HMGB1*), które wiąże się z DNA, stabilizuje nukleosomy i ułatwia transkrypcję genów. Białko HMGB 1 wykazuje cechy cytokiny i stymuluje prozapalną odpowiedź monocytów i makrofagów [157].

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na wzrost stężenia sTM w przebiegu posocznicy [153, 158, 159]. Stężenie sTM w pierwszym dniu posocznicy stanowi niezależny czynnik rozwoju DIC oraz MODS, a także wskazuje grupę pacjentów wysokiego ryzyka niepowodzenia leczenia tych powikłań [160].

W analizowanej przez nas grupie nie wykazano różnic w stężeniu sTM w okresie potransplantacyjnym pomiędzy pacjentami z i bez powikłań infekcyjnych. Natomiast, stężenie sTM natomiast w grupie pacjentów ze stwierdzoną w okresie potransplantacyjnym posocznicą było w porównaniu z dziećmi z FUO znamienne wyższe w dobie +18 oraz +25, co mogłoby świadczyć o większym nasileniu uszkodzenia komórek śródbłonka w przebiegu posocznicy. Stężenie sTM w pierwszym dniu FUO w porównaniu ze stężeniem sTM w pierwszej dobie posocznicy nie różniło się istotnie, w związku z tym stężenie sTM nie może stanowić markera różnicującego FUO z posocznicą u pacjentów po allo-HSCT. Istotnie wyższe stężenie sTM po zakończeniu leczenia FUO oraz posocznicy w porównaniu z jej stężeniem w pierwszym dniu tych powikłań może nasuwać hipotezę, że wzrost stężenia sTM jest obserwowany z opóźnieniem w stosunku do pierwszych objawów powikłań infekcyjnych (późny marker uszkodzenia śródbłonek) i/lub że efekty tego uszkodzenia są długotrwałe.

W przebiegu MODS stężenie sTM jest również podwyższone i koreluje z liczbą niewydolnych narządów. Stężenie sTM było wyższe wśród pacjentów z niepowodzeniem leczenia MODS (10.1 ± 0.7 vs. 5.1 ± 0.6 ng/ml) [160]. W pierwszym dniu MODS u obu analizowanych przez nas pacjentów stężenie sTM wynosiło 0 ng/ml (było nieoznaczalne) i wzrosło do 13,4 i 12,8 ng/ml w dniu pogorszenia stanu klinicznego dzieci. Stężenie sTM spostrzegane u naszych pacjentów było porównywalne ze stężeniem sTM u pacjentów z niewydolnością 6 narządów ($13,9 \pm 0,5$ ng/ml) w pracy przedstawionej przez Shu Min Lin i wsp. [160]. Podwyższone stężenie sTM poza licznymi wymienionymi już wcześniej mechanizmami może wynikać z upośledzonej wydolności nerek w MODS i w efekcie upośledzonego wydalania TM.

6. WNIOSKI

1. U dzieci z wczesnymi powikłaniami allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych, innymi niż ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, w zakresie układu białka C obserwuje się obniżenie aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz rozpuszczalnej trombomoduliny. U dzieci bez powikłań takich zmian w zakresie układu białka C nie spostrzega się.

2. U dzieci rodzaj choroby stanowiącej wskazanie (rozrostowa, nierozrostowa) do allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych, typ dawcy komórek krwiotwórczych (rodzeństwo, dawca niespokrewniony) i zdeterminowane tymi dwoma czynnikami kondycjonowanie (z napromienianiem całego ciała, farmakologiczne) poprzedzające transplantację mogą mieć istotny wpływ na aktywność białka C i stężenie wolnego białka S, pozostając bez wpływu na stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny.

3. U biorców komórek krwiotwórczych z ostrą chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi II^o-III^o aktywność białka C, stężenia wolnego białka S i stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny były podobne do spostrzeganych u dzieci bez objawów tej choroby lub z ostrą chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi I^o.

4. W przebiegu mikroangiopatii zakrzepowej oraz zespołu przesiąkania włóściczek po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych występuje spadek aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny, jednak podobne zmiany z zakresu układu białka C obserwowane są także w innych wczesnych powikłaniach zabiegu, stąd zmiany aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny nie mogą stanowić markerów mikroangiopatii zakrzepowej oraz zespołu przesiąkania włóściczek.

5. Aktywność białka C w pierwszej dobie posocznicy jest znamienne niższa od aktywności białka C w gorączce neutropenicznej o nieznannej etiologii i spada poniżej wartości referencyjnych, co może posłużyć jako marker różnicujący te powikłania.

6. Oporność na aktywowane białko C może stanowić w okresie potransplantacyjnym jeden z czynników ryzyka rozwoju mikroangiopatii zakrzepowej.

7. STRESZCZENIE

We wczesnym okresie po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) (do 100 doby po transplantacji) w następstwie kondycjonowania, a dodatkowo także w następstwie zakażeń i ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (aGvHD), dochodzi do uszkodzenia śródbłonek z następującą aktywacją kaskady krzepnięcia i układu dopełniacza. Na skutek powyższych zaburzeń mogą rozwinąć się zagrażające życiu powikłania, w tym zespół niedrożności żył wątrobowych (VOD), mikroangiopatia zakrzepowa (TAM), zespół przesiąkania włósniczek (CLS), a w konsekwencji również zespół niewydolności wielonarządowej (MODS).

Jednym z czynników, który po allo-HSCT może mieć istotny wpływ na wystąpienie powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonek jest układ białka C, w skład którego wchodzi białko C (PC), białko S (PS) i trombomodulina (TM). Postać wolna PS pełni rolę kofaktora reakcji przekształcenia nieaktywnej postaci PC w aktywowane PC (APC), natomiast trombina po połączeniu z trombomoduliną traci powinowactwo do fibrynogenu i staje się aktywatorem białka C. Do występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych u biorców HSC może dodatkowo przyczyniać się również oporność na aktywowane białko C (APCr), czyli oporność czynnika V na antykoagulacyjne działanie APC spowodowana najczęściej punktową mutacją genu tego czynnika (mutacja Leiden). W Polsce APCr jest najczęstszą wrodzoną trombofilią i dotyczy aż 12% chorych z zakrzepicą przed 45 rokiem życia.

Występowanie, charakter i znaczenie zaburzeń układu białka C u dzieci we wczesnym okresie po allo-HSCT nie zostało jak dotąd jednoznacznie ustalone.

Cele: 1. Ocena aktywności PC, stężenia wolnego PS oraz stężenia sTM przed allo-HSCT oraz we wczesnym okresie potransplantacyjnym w zależności od: wskazań do allo-HSCT, typu dawcy allo-HSC, kondycjonowania do allo-HSCT. 2. Ocena

aktywności PC, stężenia wolnego PS oraz stężenia sTM u biorców z TAM, CLS, gorączką neutropeniczną o nieustalonej etiologii (FUO), posocznicą, MODS we wczesnym okresie po allo-HSCT. 3. Ocena występowania APCr w okresie przedtransplantacyjnym i jej wpływu na występowanie potransplantacyjnych powikłań zakrzepowo-zatorowych (VOD, TAM).

Material i metody: Do badania prospektywnie włączono 29 dzieci w wieku od 1,7 lat do 17,1 lat (mediana 8,9 lat) poddanych allo-HSCT w Oddziale Transplantacji Szpiku, Kliniki Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od 1 października 2008 do 31 grudnia 2010. U 25 dzieci wskazaniem do allo-HSCT była choroba rozrostowa układu krwiotwórczego, u 2 ciężka nabyta niedokrwistość aplastyczna, a u 2 adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X. HSCT od zgodnego w HLA rodzeństwa (MSD) wykonano 13 (44,8%) pacjentów, od zgodnego dawcy niespokrewnionego (MUD) u 14 (48,3%), a od dawcy haploidentycznego (haplo) u 2 (6,9%). Źródłem komórek krwiotwórczych u 14 (48,3%) dzieci był szpik (BM), u 14 (48,3%) krew obwodowa (PB), u 1 (3,4%) krew pępowinowa (CB). Przeszczepiono $4,6 \times 10^6$ ($0,6-12 \times 10^6$) komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Kondycjonowanie w oparciu o napromienianie całego ciała (FTBI) przeprowadzono u 9 chorych (31%), a farmakologiczne u 20 (69%). Przed MUD- i przed haplo-HSCT w celu uzyskania deplecji limfocytów T *in vivo* dodatkowo podawano ATG (n=14; 48,3%) lub przeciwciała monoklonalne anty-CD52 (Campath) (n=3; 10,3%) W profilaktyce GvHD po MSD-HSCT stosowano CsA (n=13; 44,8%), a po MUD-HSCT najczęściej CsA i MTX (n=13; 44,8%). Po haplo-HSCT nie stosowano profilaktyki GvHD.

Grupę kontrolną (n=6) stanowili pacjenci, u których nie stwierdzono klinicznie jawnych wczesnych powikłań allo-HSCT.

Krew do badań pobierano przed kondycjonowaniem oraz w dniach 0, +5, +11, +18, +25, +39, +53 oraz dodatkowo w chwili rozpoznania powikłania i po stwierdzeniu ustępowania lub progresji jego objawów. Aktywność PC oznaczono metodą chromogenną, stężenie wolnego PS oraz stężenie sTM przy użyciu ELISA. Wartości referencyjne: PC 70-140%, PS >50%, TM 2,73-4,79 ng/ml. Do oznaczenia APCr krew pobierano przed rozpoczęciem kondycjonowania. Wartości referencyjne APCr wynosiły 2,0-4,0. U pacjentów, u których stwierdzono APCr ≤ 2 wykonano badanie metodą PCR w kierunku mutacji genu czynnika V (Leiden).

Wyniki:

1. W odróżnieniu od grupy kontrolnej (bez powikłań) wśród dzieci z wczesnymi powikłaniami allo-HSCT obserwowano obniżenie aktywności PC, spadek stężenia wolnego PS oraz sTM w stosunku do okresu przed rozpoczęciem terapii kondycjonującej z najniższymi wartościami odpowiednio w dobach +5, 0 oraz +5.
2. Aktywność PC była znamienne niższa w dobach 0, +5, +11 wśród dzieci, u których wskazaniem do allo-HSCT była choroba rozrostowa, w dobie +5 u dzieci kondycjonowanych FTBI oraz u których przeszczepiono $\geq 3 \times 10^6$ CD34+/kg masy ciała biorcy. Znamienne niższe stężenie wolnego PS stwierdzono w dobach +5, +11 u dzieci z chorobą rozrostową oraz po MSD-HSCT. Nie wykazano różnic statystycznych stężeń sTM w zależności od wskazania do allo-HSCT, typu dawcy HSC, zastosowanego kondycjonowania, źródła oraz liczby komórek HSC.
3. Aktywność PC, stężenie wolnego PS, stężenie sTM u 6 (35%) chorych z aGvHD II^o-III^o były podobne jak u pacjentów bez aGvHD lub z aGvHD I^o.

4. TAM rozpoznano u 3 (10,3%) pacjentów, a CLS u 3 (10,3%) chorych. U pacjentów z CLS i TAM aktywność PC w dobie +5 ($68,3\% \pm 29,9\%$), stężenie wolnego PS w dobie +11 ($65,5\% \pm 17,2\%$) były znacząco niższe w stosunku do odpowiednio aktywności i stężenia tych białek w grupie kontrolnej ($p=0,001$; $p=0,041$). Aktywność PC ($77,4 \pm 40,8\%$) i stężenie wolnego PS ($53,8 \pm 20,4\%$) znacząco wzrastały po zakończeniu leczenia CLS i TAM ($p=0,049$; $p=0,015$). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic stężeń sTM u pacjentów z CLS i TAM w poszczególnych punktach czasowych w porównaniu z grupą kontrolną.
5. Zaobserwowano 26 powikłań infekcyjnych u 23 (79,3%) biorców HSC, w tym 14 FUO (53,8%) i 12 posocznicy bakteryjnych (46,2%). Średnia aktywność PC w pierwszym dniu FUO wynosiła $78,5 \pm 23,6\%$ i była istotnie wyższa od aktywności PC w pierwszej dobie posocznicy $49,5 \pm 12,2\%$ ($p=0,002$), natomiast stężenia wolnego PS i sTM były podobne. Po zakończeniu leczenia posocznicy, zarówno aktywność PC, jak i stężenie wolnego PS oraz stężenie sTM były znacząco wyższe (PC: $p<0,001$; PS: $p<0,001$; sTM: $p=0,018$). Znaczący wzrost po zakończeniu leczenia FUO obserwowano tylko w zakresie aktywności PC ($p=0,003$) i stężenia sTM ($p=0,009$).
6. W badanej grupie APCr wynosiło od 1,35 do 4,1 (mediana 2,57). Wartości poniżej 2 stwierdzono wśród 7 (24,1%) pacjentów badanej populacji. U wszystkich potwierdzono obecność mutacji genu czynnika V (Leiden). U 3 pacjentów, u których rozpoznano TAM, stwierdzono w okresie przedtransplantacyjnym APCr poniżej 2 ($p<0,001$).

Wnioski: 1. U dzieci z wczesnymi powikłaniami allogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych, innymi niż ostra choroba przeszczep przeciwko

gospodarzowi, w zakresie układu białka C obserwuje się obniżenie aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz rozpuszczalnej trombomoduliny. U dzieci bez powikłań takich zmian w zakresie układu białka C nie spostrzega się. 2. U dzieci rodzaj choroby stanowiącej wskazanie (rozrostowa, nierozrostowa) do allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych, typ dawcy komórek krwiotwórczych (rodzeństwo, dawca niespokrewniony) i zdeterminowane tymi dwoma czynnikami kondycjonowanie (z napromienianiem całego ciała, farmakologiczne) poprzedzające transplantację mogą mieć istotny wpływ na aktywność białka C i stężenie wolnego białka S, pozostając bez wpływu na stężenie rozpuszczalnej trombomoduliny. 3. U biorców komórek krwiotwórczych z ostrą chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi II^o-III^o aktywność białka C, stężenia wolnego białka S i stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny były podobne do spostrzeganych u dzieci bez objawów tej choroby lub z ostrą chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi I^o. 4. W przebiegu mikroangiopatii zakrzepowej oraz zespołu przesiąkania włóśniczek po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych występuje spadek aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny, jednak podobne zmiany z zakresu układu białka C obserwowane są także w innych wczesnych powikłaniach zabiegu, stąd zmiany aktywności białka C, stężenia wolnego białka S i rozpuszczalnej trombomoduliny nie mogą stanowić markerów mikroangiopatii zakrzepowej oraz zespołu przesiąkania włóśniczek. 5. Aktywność białka C w pierwszej dobie posocznicy jest znamienne niższa od aktywności białka C w gorączce neutropenicznej o nieznannej etiologii i spada poniżej wartości referencyjnych, co może posłużyć jako marker różnicujący te powikłania. 6. Oporność na aktywowane białko C może stanowić w

okresie potransplantacyjnym jeden z czynników ryzyka rozwoju mikroangiopatii zakrzepowej.

8. SUMMARY

In the early period after an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo HSCT) – i.e. up to day 100 after the transplantation, the effects of the preparative conditioning regimen, additionally aggravated by infections and acute graft versus host disease (aGvHD), lead to endothelial injury with the resulting activation of the coagulation cascade and the complement pathway. The consequences of these disturbances may be the following life-threatening complications: veno-occlusive disease (VOD), thrombotic microangiopathy (TAM), capillary leak syndrome (CLS), and multiorgan dysfunction syndrome (MODS).

One of the factors which may have a significant impact on the occurrence of early allo HSCT complications associated with endothelial injury is the protein C pathway consisting of: protein C (PC) and its receptor, protein S (PS) and thrombomodulin (TM). Free protein S acts as a cofactor in the activation of PC while thrombin-thrombomodulin complex formation causes thrombin to lose its fibrinogen clotting activity and to become the activator of protein C. Thrombotic complications in recipients of HSC may also be additionally linked to activated protein C resistance (APCr), i.e. factor V resistance to anticoagulation activity of activated protein C, resulting most commonly from the Leiden mutation of the factor V gene. In Poland, APCr is the most common thrombophilia and is observed in 12% of thrombosis patients under 45 years of age.

However, the occurrence, character and relevance of protein C pathway disturbances in children in the early post allo HSCT period have not been confirmed yet.

Aims: 1. To evaluate and compare PC activity, free PS concentrations and sTM concentrations before and early after allo HSCT, depending on: indications for allo HSCT, donor type and preparative conditioning regimen (prep-reg). 2. To evaluate and compare PC activity, free PS concentrations and sTM concentrations in recipients of allo-HSC who suffer from TAM, CLS, VOD, FUO, sepsis and MODS in the early period after allo HSCT. 3. To analyze the occurrence of APCr prior to the transplant and the impact of APCr on the occurrence of post-transplant thrombotic complications (VOD, TAM).

Material and methods: Total of 29 children with median age of 8.9 years (range: 1.7-17.1 years) who underwent allo-HSCT at the Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, between 1st October 2008 and 31st December 2010. Indications for allo-HSCT were as follows: a malignancy of the hematopoietic system – 25 children; severe acquired aplastic anemia – 2 children, X-linked adrenoleucodystrophy – 2 children. In 13 cases (44.8%) HSCT was performed from a matched sibling donor (MSD); in 14 (48.3%) – from a matched unrelated donor (MUD); in 2 (6.9%) – from a haploidentical donor (haplo). 14 (48.3%) patients received BM HSC, 14 (48.3%) – PB HSC and 1 (3.4%) – CB HSC. Recipients of HSC received 4.6×10^6 ($0.6-12 \times 10^6$) CD34+ cells/kg. The prep-reg was based on FTBI (n=9; 31%) or pharmacology (n=20; 69%). Prior to MUD-HSCT and haplo-HSCT, GvHD prophylaxis in vivo included ATG (n=14; 48.3%) or anti-CD52 monoclonal antibody (Campath, n=3; 10.3%). After MSD HSCT, GvHD prophylaxis included CsA (n=13; 44.8%), and after MUD-HSCT – CsA plus MTX (n=13; 44.8%). No GvHD prophylaxis was administered after haplo HSCT.

The control group (n=6) comprised patients with no clinically overt evidence of early complications after allo-HSCT.

Blood samples were taken at the following time points: before the start of preparatory regimen and then on days: 0, +5, +11, +18, +25, +39, +53 and, additionally, at the moment of diagnosing early complications and, subsequently, after detecting an improvement/deterioration in the patient's clinical status. PC activity was measured by chromogenic assay, free PS concentrations and sTM concentrations – by ELISA. (Normal ranges: PC 70-140%, PS >50%, sTM 2.73-4.79 ng/ml). APCr was evaluated before the start of preparatory regimen. Normal range for APCr ratio is 2.0-4.0. In children with APCr ratio below 2, PCR was used to evaluate mutation of factor V gene (Leiden).

Results:

1. Compared to the control group (no complications), in children with early complications after allo-HSCT a decreased PC activity and a decrease in free PS concentration and sTM concentration was observed, relative to the period prior to the start of the conditioning regimen, with lowest values on days +5, 0 and +5, respectively.
2. PC activity was significantly lower on days 0, +5, +11 in children whose indication for allo-HSCT was a malignancy; and on day +5 in patients conditioned with FTBI and in those who received $\geq 3 \times 10^6$ CD34⁺/kg. Free PS concentrations were significantly lower on days +5 and +11 in children with malignancies and in patients after MSD HSCT. For sTM concentrations no statistically significant differences were found in relation to specific indications for allo-HSCT, donor type, conditioning regimen, and source and number of transplanted HSC.

3. PC activity, free PS concentrations, and sTM concentrations in patients with aGvHD II^o-III^o (n=6) vs. the respective parameters in patients with aGvHD 0-I^o (n=11) were similar (no statistical differences were found).
4. According to criteria proposed by Ruutu et al. (2007), TAM was diagnosed in 3 (10.3%) children. CLS, according to Nürnberger et al. criteria (1997), was observed in 3 patients (10.3%). In patients with CLS and TAM, PC activity on day +5 (68.3%±29.9%) and free PS concentrations on day +11 (65.5%±17.2%) were significantly lower, compared to the activity and concentrations of these proteins in the control group: 118%±47.4% (p=0.001) and 91.8%±24% (p=0.041), respectively. PC activity (77.4±40.8%) and free PS concentrations (53.8±20.4%) increased significantly after the completion of CLS and TAM treatment (PC: 122.8±42.9%, PS: 91.6±24.6%). No significant differences with regard to sTM concentrations in children with CLS and TAM were found, compared to control group.
5. In total, 26 cases of infectious complications which occurred in 23 (79.3%) HSC recipients were diagnosed in the early post-transplant period, including 14 (53.8%) FUO and 12 (46.2%) sepsis cases. The mean PC activity on the first day of FUO was 78.5±23.6% and was significantly higher than that found on the first day of sepsis (49.5±12.2%; p=0.002). There were no differences in PS and sTM concentrations. After treatment for sepsis, PC activity, free PS concentrations and sTM concentrations were significantly higher (PC: p<0.001; PS: p=<0.001; sTM: p=0.018). After treatment for FUO, PC activity (p<0.001) and sTM concentrations (p=0.009) increased significantly.
6. Median APCr ratio was 2.57 (range: 1.35 do 4.1). APCr ratio below 2 was observed in 7 (24.1%) children. Mutation of factor V gene (Leiden) was

confirmed in all children with APCr ratio below 2. TAM was diagnosed in 3 of 7 children with mutation of factor V gene (Leiden) ($p < 0.001$).

Conclusions: 1. In children with early post-transplant complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation other than acute graft versus host disease, decreased protein C activity and decreased concentrations of free protein S and soluble thrombomodulin were observed. No disturbances in the C protein pathway have been found in children without early complications. 2. In children, the type of disease which represents an indication for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (malignant, non-malignant), donor type (sibling, unrelated) and the preparative conditioning regimen (fractionated total body irradiation, pharmacological) determined by these two factors may have a significant impact on the activity of protein C and the concentration of free protein S, while having no impact on the concentration of soluble thrombomodulin. 3. Protein C activity, free protein S concentrations or soluble thrombomodulin concentrations in children with no acute graft versus host disease or acute graft versus host disease stage I, show no differences versus children with graft versus host disease stage II III. 4. In the course of thrombotic microangiopathy and capillary leak syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, a decrease in the activity of protein C, and a decrease in the concentration of free protein S and soluble thrombomodulin were observed. However, these changes concerning the activity of protein C and the concentrations of free protein S or soluble thrombomodulin may not be used as markers of these complications, because similar changes are also observed in other early complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 5. The activity of protein C on the first day of sepsis is significantly lower than on the first day of fever of unknown origin, and falls below normal ranges. This might be used as a differentiating marker for these two infectious complications

after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 6. Activated protein C resistance might represent a risk factor for the development of thrombotic microangiopathy in the post-transplant period this conclusion, however, needs further investigation.

PIŚMIENNICTWO

1. Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T.: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 639-646.
2. Gratwohl A, Baldomero H, Schwendener A, Gratwohl M, Apperley J, Frauendorfer K, Niederwieser D, for the Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy ISCT and the European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT (JACIE). The EBMT activity survey 2008: impact of team size, team density and new trend. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46: 174–191.
3. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of the irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Nat Cancer Inst.* 1951; 12: 197-201.
4. Gale RP, Butturini A, Bortin MM. What does total body irradiation do in bone marrow transplants for leukemia? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991; 20(3): 631-634.
5. Shank B, Hoppe RT. Radiotherapeutic principles of hematopoietic cell transplantation. [w]: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Hematopoietic cell transplantation. Blackwell Scientific Publ. Boston 2004: 178.
6. Tarbell NJ, Amato DA, Down JD, Mauch P, Hellman S. Fractionation and dose rate effects in mice: a model for bone marrow transplantation in man. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987; 13(7): 1065-1069.
7. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol.* 1989; 62(740): 679-694.
8. Shankar G, Cohen DA. Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: the role of pre-transplant radiation conditioning and local cytokine dysregulation in promoting lung inflammation and fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2001; 82(2): 101-113.

9. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Damiani D, Cerno M, Geromin A, Zaja F, Stocchi R, Prosdocimo S, Fili C, Fanin R. Incidence, outcome, and risk factors of late-onset noninfectious pulmonary complications after unrelated donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33(7): 751-758.
10. Patriarca F, Poletti V, Costabel U, Battista ML, Sperotto A, Medeot M, Toffoletti E, Fanin R. Clinical presentation, outcome and risk factors of late-onset non-infectious pulmonary complications after allogeneic stem cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009; 4(2): 161-167.
11. Sale GE, Shulman HM, Hackman RC. Pathology of hematopoietic cell transplantation. [w]: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Hematopoietic cell transplantation. Blackwell Scientific Publ. Boston 2004: 286.
12. Barker CC, Anderson RA, Sauve RS, Butzner JD. GI complications in pediatric patients post-BMT. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36(1): 51-58.
13. Strasser IS, McDonald GB. Gastrointestinal and hepatic complications. [w]: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Hematopoietic cell transplantation. Blackwell Scientific Publ. Boston 2004: 769.
14. Schubert MM, Peterson DE, Lloid ME. Oral complications. [w]: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Hematopoietic cell transplantation. Blackwell Scientific Publ. Boston 2004: 911.
15. van der Velden WJ, Blijlevens NM, Feuth T, Donnelly JP. Febrile mucositis in haematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43(1): 55-60.
16. Bensinger WI, Spielberger R. Preparative regimens and modifications of regimen-related toxicity. [w]: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED. Hematopoietic cell transplantation. Blackwell Scientific Publ. Boston 2004: 158.

17. Potting CM, Blijlevens NA, Donnelly JP, Feuth T, Van Achterberg T. A scoring system for the assessment of oral mucositis in daily nursing practice. *Eur J Cancer Care*. 2006; 15(3): 228-234.
18. Vagliano L, Feraut C, Gobetto G, Trunfio A, Errico A, Campani V, Costazza G, Mega A, Matozzo V, Berni M, Alberani F, Banfi MM, Martinelli L, Munaron S, Orlando L, Lubiato L, Leanza S, Guerrato R, Rossetti A, Messina M, Barzetti L, Satta G, Dimonte V. Incidence and severity of oral mucositis in patients undergoing haematopoietic SCT (HSCT)-results of a multicentre study. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46(5): 727-732.
19. Miano M, Faraci M, Dini G, Bordigoni P; EBMT Paediatric Working Party. Early complications following haematopoietic SCT in children. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41 Suppl 2: 39-42.
20. Carreras E. Early complications after HSCT. [w:] *The EBMT Handbook. Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. 2008.
21. Buchali A, Feyer P, Groll J, et al.: Immediate toxicity during fractionated total body irradiation as conditioning for bone marrow transplantation. *Radiother Oncol*. 2000; 54(2): 157-162.
22. Goldberg SL, Tefferi A, Rummans TA, Chen MG, Solberg LA, Noel P. Post-irradiation somnolence syndrome in an adult patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 9(6): 499-501.
23. Faraci M, Barra S, Cohen A, et al.: Very late nonfatal consequences of fractionated TBI in children undergoing bone marrow transplant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; 63(5): 1568-1575.

24. Berger C, Le-Gallo B, Donadieu J, et al.: Late thyroid toxicity in 153 long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35(10): 991-995.
25. Chemaitilly W, Boulad F, Heller G, et al.: Final height in pediatric patients after hyperfractionated total body irradiation and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40(1): 29-35.
26. Chemaitilly W, Sklar C.: Endocrine complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007; 36(4): 983-998.
27. Bartelink IH, Bredius RG, Ververs TT, et al.: Once-daily intravenous busulfan with therapeutic drug monitoring compared to conventional oral busulfan improves survival and engraftment in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(1): 88-98.
28. Hoy SM, Lyseng-Williamson.: Intravenous busulfan: in the conditioning treatment of pediatric patients prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Paediatr Drugs.* 2007; 9(4): 271-278.
29. Geddes M, Kangaroo SM, Naveed F, et al.: High busulfan exposure is associated with worse outcomes in a daily i.v. busulfan and fludarabine allogeneic transplant regimen. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(2): 220-228.
30. Hilger RA, Jacek G, Oberhoff C, et al.: Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of Treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 45: 483-488.
31. Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, et al.: Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetics study of high-dose chemotherapy with Treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research.* 2000; 6: 4209-4216.

32. Grazziutti ML, Dong L, Miceli MH, et al.: Oral mucositis in myeloma patients undergoing melphalan-based autologous stem cell transplantation: incidence, risk factors and a severity predictive model. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38(7): 501-506.
33. Ritchie DS, Seymour JF, Roberts AW, et al.: Acute left ventricular failure following melphalan and fludarabine conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28(1): 101-103.
34. Tricot G, Alberts DS, Johnson C, et al.: Safety of autotransplants with high-dose melphalan in renal failure: a pharmacokinetic and toxicity study. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(6): 947-952.
35. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, et al.: Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003; 101(5): 2043-2048.
36. Huitema AD, Spaander A, Mathit R, et al.: Relationship between exposure and toxicity in high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, tiotepa and carboplatin. *Ann Oncol.* 2002; 13(3): 374-384.
37. Zuer S.: Cardiac toxicity of high-dose cyclophosphamide in patients with multiple myeloma undergoing auto-HSCT. *Int J Hemat.* 2007; 85(5): 408-414.
38. Marigny K, Aubin F, Burgot G, et al.: Particular cutaneous side effects with etoposide-containing courses: is VP16 or etoposide phosphate responsible? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 55(3): 244-250.
39. Imrie KR, Couture F, Turner CC, et al.: Peripheral neuropathy following high-dose etoposide and autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 13: 77-79.

40. Waaler BA. Simultaneous contribution to the formation of thrombin by the intrinsic and extrinsic blood clotting systems. *Scand J Clin Lab Invest.* 1957; 9: 322-330.
41. Drake TA, Cheng J, Chang A. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1458-1470.
42. Dalainas I. Pathogenesis, diagnosis, and management of disseminated intravascular coagulation: a literature review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2008; 12(1): 19-31.
43. Bauer KA, ten Cate H, Barzegar S. Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood.* 1989; 74: 165-172.
44. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun.* 2010; 2(5): 422-430.
45. Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1233-1243.
46. Osterud B, Flaegstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavorable prognosis. *Thromb Haemost.* 1983; 49: 5-7.
47. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; 6: 7-13.
48. Masys DR, Bajaj SP, Rapaport SI. Activation of human factor VII by activated factors IX and X. *Blood.* 1982; 60: 1143-1150.
49. Petaja J, Manco-Johnson MJ. Protein C pathway in infants and children. *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29(4): 349-362.
50. Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest.* 2003; 124: 26-32.

51. Lignell A, Siegbahn A, Stritsberg M, Pauksen K, Gedeberg R, Sjölin J. Low utilisation of unactivated protein C in a patient with meningococcal septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2003; 47: 897-900.
52. Pihusch M, Wegner H, Goehring P, Salat C, Pihusch V, Andreesen R, Kolb HJ, Holler E, Pihusch R. Protein C and procollagen III peptide levels in patients with hepatic dysfunction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36(7): 631-637.
53. Webb JH, Villoutreix BO, Dahlbäck B, and Blom AM. Localization of a hydrophobic binding site for anticoagulant protein S on the beta-chain of complement regulator C4b-binding protein. *J Biol Chem.* 2001; 276: 4330-4337.
54. Webb JH, Blom AM, and Dahlbäck B. Vitamin K-dependent protein S localizing complement regulator C4b-binding protein to the surface of apoptotic cells. *J Immunol.* 2002; 169: 2580-2586.
55. Blom AM, Webb J, Villoutreix BO, and Dahlbäck B. A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. *J Biol Chem.* 1999; 274: 19237-19245.
56. Lewandowski K, Turowiecka Z, Rozek M, Markiewicz WT, Zawilska K. Mutacja punktów G – A nukleotydów 1691 genu czynnika V przyczyną powikłań zakrzepowych w rodzinie z opornością osocza na działanie aktywnego białka C. *Pol Arch Med Wewn.* 1996; 4: 318-322.
57. Rosendorff A, Dorfman DM. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 866–871.
58. Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG, Yan B, Chao YB, Fernandez JA, Griffin JH, Hartman DL. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med.* 2000; 28(7): 2209-2216.

59. Haire WD. Multiple organ dysfunction syndrome in hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Care Med.* 2002; 30: 257-262.
60. Eber SW, Gungor T, Veldman A, Sykora K, Scherer F, Fischer D, Grigull L. Favorable response of pediatric stem cell recipients to human protein C concentrate substitution for veno-occlusive disease. *Pediatr Transplant.* 2007; 11(1): 49-57.
61. Matthes-Martin S, Pötschger U, Bergmann K, Frommlet F, Brannath W, Bauer P, Klingebiel T. Risk-adjusted outcome measurement in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(3): 335-343.
62. Cheuk DK, Wang P, Lee TL, Chiang AK, Ha SY, Lau YL, Chan GC. Risk factors and mortality predictors of hepatic veno-occlusive disease after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40(10): 935-944.
63. Battistini B, D'Orléans-Juste P, Sirois P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest.* 1993; 68(6): 600-628.
64. Cesaro S, Pillon M, Talenti E, Toffolutti T, Calore E, Tridello G, Strugo L, Destro R, Gazzola MV, Varotto S, Errigo G, Carli M, ZanESCO L, Messina C. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2005; 90(10): 1396-1404.
65. Barker CC, Butzner JD, Anderson RA, Brant R, Sauve RS. Incidence, survival and risk factors for the development of veno-occlusive disease in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32(1): 79-87.
66. Eber SW, Gungor T, Veldman A, Sykora K, Scherer F, Fischer D, Grigull L. Favorable response of pediatric stem cell recipients to human protein C concentrate substitution for veno-occlusive disease. *Pediatr Transplant.* 2007; 11(1): 49-57.

67. McDonald GB, Sharma P, Hackman RC, Meyers JD, Thomas ED. Esophageal infections in immunosuppressed patients after marrow transplantation. *Gastroenterology*. 1985; 88(5): 1111-1117.
68. Walsh TJ, Belitsos NJ, Hamilton SR. Bacterial esophagitis in immunocompromised patients. *Arch Intern Med*. 1986; 146(7): 1345-1348.
69. Cohen M, Taylor MB. Phlegmonous gastritis. [w]: Taylor MB, Gollan JL, Steer ML, Wolfe MM. *Gastrointestinal emergencies*. Baltimore. Williams & Wilkins, 1997: 219-223.
70. Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42 (Suppl) 1: 70-72.
71. Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, Ganepola S, Reinke P, Thiel E, Uharek L, Blau IW. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. *Int J Hematol*. 2010; 91(5): 877-885.
72. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010; 115(19): 3861-3868.
73. www.ichs.org
74. Sakr Y, Sponholz C, Tuche F, Brunkhorst F, Reinhart K. The role of procalcitonin in febrile neutropenic patients: review of the literature. *Infection*. 2008; 36(5): 396-407.
75. Dell'Orto M, Rovelli A, Barzagli A, Valsecchi MG, Silvestri D, Giltri G, Balduzzi A, Biagi E, Arrigo C, Rossi MR, Masera G, Uderzo C. Febrile complications in the first 100 days after bone marrow transplantation in children: a single center's experience. *Pediatr Hematol Oncol*. 1997; 14(4): 335-347.

76. Mullen CA, Nair J, Sandesh S, Chan KW. Fever and neutropenia in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(1): 59-65.
77. Kolbe K, Domkin D, Derigs HG, Bhakdi S, Huber C, Aulitzky WE. Infectious complications during neutropenia subsequent to peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19(2): 143-147.
78. Ringdén O, Remberger M, Runde V, Bornhäuser M, Blau IW, Basara N, Hölig K, Beelen DW, Hägglund H, Basu O, Ehninger G, Fauser AA. Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25 Suppl 2: 6-8.
79. Nosanchuk JD, Sepkowitz KA, Pearse RN, White MH, Nimer SD, Armstrong D. Infectious complications of autologous bone marrow and peripheral stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18(2): 355-359.
80. Hambach L, Eder M, Dammann E, Schrauder A, Sykora KW, Dieterich C, Kirschner P, Novotny J, Ganser A, Hertenstein B. Diagnostic value of procalcitonin serum levels in comparison with C-reactive protein in allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2002; 87(6): 643-651.
81. van Gestel JP, Bollen CW, van der Tweel I, Boelens JJ, van Vught AJ. Intensive care unit mortality trends in children after hematopoietic stem cell transplantation: a meta-regression analysis. *Crit Care Med.* 2008; 36(10): 2898-2904.
82. Diaz MA, Vicent MG, Prudencio M, Rodriguez F, Marin C, Serrano A, Sevilla J, Casado J, Madero L. Predicting factors for admission to an intensive care unit and

clinical outcome in pediatric patients receiving hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2002; 87(3): 292-298.

83. Schneider DT, Lemburg P, Sprock I, Heying R, Göbel U, Nürnberger W. Introduction of the oncological pediatric risk of mortality score (O-PRISM) for ICU support following stem cell transplantation in children. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25(10): 1079-1086.

84. Jacobe SJ, Hassan A, Veys P, Mok Q, Bratton SL, Van Duker H, Statler KD, Pulsipher MA, McArthur J, Keenan HT. Lower hospital mortality and complications after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Care Med*. 2008; 36(3): 923-927.

85. González-Vicent M, Marín C, Madero L, Sevilla J, Díaz MA. Risk score for pediatric intensive care unit admission in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and analysis of predictive factors for survival. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005; 27(10): 526-531.

86. Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, Locatelli F, Fischer A, Egeler R, Or R, Peters C, Ortega J, Veys P, Bordigoni P, Iori A, Niethammer D, Rocha V, Dini G, for the Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 39 (2): 89-99

87. Glucksberg H, Storb R, Feler A, et al.: Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplant*. 1974; 18: 295-303.

88. Deeg H.: Prophylaxis and treatment of acute graft-versus-host disease: current state, implications of new immunopharmacologic compounds, and future strategies to prevent and treat acute GvHD in high-risk patients. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14: 61.
89. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica.* 2007; 92(1): 95-100.
90. Płusa T. Patomechanizm i klinika sepsy. *Przew Lek.* 2008; 1: 192-194.
91. de Pauw BE, Vewey PE. Infections in patients with hematologic malignancies. [w:] *Principles and practice in infectious diseases.* red. GL. Mandel, JE Bennett, Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia 2005, 3079.
92. de Pauw BE, Vewey PE. Infections in the immunocompromised host: general principles. [w:] *Principles and practice in infectious diseases.* red. GL. Mandel, JE Bennett, Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia 2005, 3102.
93. Procedury diagnostyki mikrobiologicznej w wybranych zakażeniach układowych. Red. A. Przado-Mordarska, Wydawnictwo Continuo, Wrocław 2004.
94. Tomaszewska A, Jędrzejczak WW: Powikłania infekcyjne u chorych hematologicznych- gorączka neutropeniczna i jej leczenie. *Zakażenia.* 2006; 4: 26-38.
95. Marchetti O, Cordonnier C, Calandra T. Empirical antifungal therapy in neutropenic cancer patients with persistent fever. *EJC.* 2007; (Suppl. 5): 32-42.
96. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 730.

97. Matysiak M. Empiryczna antybiotykoterapia u gorączkujących chorych w neutropenii. *Zakażenia*. 2004; 1: 1-4.
98. Picazo JJ. Management of the febrile neutropenic patient. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 26: 120-122.
99. Seweryn M, Hołowiecki J, Lech-Marańda E, et al. Standardy postępowania w leczeniu chorób infekcyjnych w stanach neutropenii i nowotworowych zaburzeniach odporności. *Acta Haemat Pol*. 2003; 34: 151-167.
100. Glasmacher A, von Lilienfeld-Total M, Schulze S, et al. An evidence-based evaluation of important aspects of empirical antibiotic therapy in febrile neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11 (5): 17-23.
101. Laurent OM, Berislav VZ, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007; 109: 3161-3172.
102. Jackson CJ, Xue M. Activated protein C--an anticoagulant that does more than stop clots. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(12): 2692-2697.
103. Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*. 2008; 61(1-2): 122-131.
104. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. 2005; 131(4): 417-430.
105. Kanamori H, Maruta A, Sasaki S, Yamazaki E, Ueda S, Katoh K, Tamura T, Otsuka-Aoba M, Taguchi J, Harano H, Ogawa K, Mohri H, Okubo T, Matsuzaki M, Watanabe S, Koharazawa H, Fujita H, Kodama F. Diagnostic value of hemostatic

parameters in bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21(7): 705-709.

106. Yenicesu I, Uckan D, Cetin M, et al. Evaluation of coagulation in pediatric bone marrow transplantation patients. *Pediatr Transplantation* 2001; 5: 430–433.

107. Pihusch M, Wegner H, Goehring P, Salat C, Pihusch V, Andreesen R, Kolb HJ, Holler E, Pihusch R. Protein C and procollagen III peptide levels in patients with hepatic dysfunction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36(7): 631-637.

108. Harper PL, Jarvis J, Jennings I et al. Changes in the natural anticoagulants following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1990; 5: 39-42.

109. Brandao LR; Kletzel M, Boulad F, Kurtzberg J, Maloney K, Fligman I, Sison CP, DiMichele D. A Prospective Longitudinal Multicenter Study of Coagulation in Pediatric Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2008; 50: 1240–1246.

110. Inbal A, Lubetsky A, Shimoni A, Dardik R, Sela BA, Eskaraev R, Levi I, Tov NS, Nagler A. Assessment of the coagulation profile in hemato-oncological patients receiving ATG-based conditioning treatment for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 34(5): 459-463.

111. Weber M, Kroger N, Langer F, et al. Non-overt disseminated intravascular coagulation in patients during treatment with antithymocyte globulin for unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 817-822.

112. Scrobahaci ML, Drouet L, Monem-Mansi A, Devergie A, Baudin B, D'Agay MF, Gluckman E. Liver veno-occlusive disease after bone marrow transplantation changes in coagulation parameters and endothelial markers. *Thromb Res.* 1991; 63(5): 509-519.
113. Faioni EM, Krachmalnicoff A, Bearman SI, Federici AB, Decarli A, Gianni AM, McDonald GB, Mannucci PM. Naturally occurring anticoagulants and bone marrow transplantation: plasma protein C predicts the development of venoocclusive disease of the liver. *Blood.* 1993; 81(12): 3458-3462.
114. Iguchi A, Ryoji K, Makoto K, Kunihiro K. Plasma protein C is a useful clinical marker for hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 54: 437-443.
115. Pihusch M, Wegner H, Goehring P, Salat C, Pihusch V, Hiller E, Andreesen R, Kolb HJ, Holler E, Pihusch R. Diagnosis of hepatic veno-occlusive disease by plasminogen activator inhibitor-1 plasma antigen levels: a prospective analysis in 350 allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation.* 2007; 80(10): 1376-1382.
116. Rio B, Bauduer F, Arrago JP, Zittoun R. N-terminal peptide of type III procollagen: a marker for the development of hepatic veno-occlusive disease after BMT and a basis for determining the timing of prophylactic heparin. *Bone Marrow Transplant.* 1993; 11(6): 471-472.
117. Eltumi M, Trivedi P, Hobbs JR, Portmann B, Cheeseman P, Downie C, Risteli J, Risteli L, Mowat AP. Monitoring of veno-occlusive disease after bone marrow transplantation by serum aminopropeptide of type III procollagen. *Lancet.* 1993; 342(8870): 518-521.

118. Heikinheimo M, Halila R, Fasth A. Serum procollagen type III is an early and sensitive marker for veno-occlusive disease of the liver in children undergoing bone marrow transplantation. *Blood*. 1994; 83(10): 3036-3040.
119. Role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in the diagnosis of BMT-associated hepatic veno-occlusive disease and monitoring of subsequent therapy with defibrotide (DF). *Hematology*. 2003; 8(2): 91-95.
120. Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG, Yan B, Chao YB, Fernandez JA, Griffin JH, Hartman DL. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med*. 2000; 28(7): 2209-2216.
121. Kassam A, Chan AK, Dzolganovski B, Constantin J, Ramphal R, Grant R, Sung L. No association between protein C levels and bacteremia in children with febrile neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009; 31(9): 647-650.
122. Haire WD. Multiple organ dysfunction syndrome in hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Care Med*. 2002; 30 (5 Suppl): 257-262.
123. Dhainaut JF, Laterre PF, Janes JM, Bernard GR, Artigas A, Bakker J, Riess H, Basson BR, Charpentier J, Utterback BG, Vincent JL; Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Sepsis (PROWESS) Study Group. Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multiple-organ dysfunction: data from the PROWESS trial. *Intensive Care Med*. 2003; 29(6): 894-903.
124. Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, François B, Guy JS, Brückmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL; Administration of Drotrecogin Alfa (Activated) in Early

Stage Severe Sepsis (ADDRESS) Study Group. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med.* 2005; 353(13): 1332-1341.

125. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, Dalton H, Peters M, Macias WL, Abd-Allah SA, Levy H, Angle R, Wang D, Sundin DP, Giroir B; REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspective (RESOLVE) study group. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 369(9564): 836-843.

126. Finfer S, Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Gårdlund B, Marshall JC, Rhodes A. Design, conduct, analysis and reporting of a multi-national placebo-controlled trial of activated protein C for persistent septic shock. *Intensive Care Med.* 2008; 34(11): 1935-1947.

127. Alaniz C. An update on activated protein C (xigris) in the management of sepsis. *P T.* 2010; 35(9): 504-529.

128. Levi M, Levy M, Williams MD, Douglas I, Artigas A, Antonelli M, Wyncoll D, Janes J, Booth FV, Wang D, Sundin DP, Macias WL; Xigris and Prophylactic HepaRin Evaluation in Severe Sepsis (XPRESS) Study Group. Prophylactic heparin in patients with severe sepsis treated with drotrecogin alfa (activated). *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(5): 483-490.

129. Pastores SM, Shaw A, Williams MD, Mongan E, Alicea M, Halpern NA. A safety evaluation of drotrecogin alfa (activated) in hematopoietic stem cell transplant patients with severe sepsis: lessons in clinical research. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36(8): 721-724.

130. Sarig G, Miacheli Y, Lanir N, Brenner B, Haim N. Mechanisms for acquired activated protein C resistance in cancer patients. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 589–590.

131. Haim N, Lanir N, Hoffman R, Haim A, Tsalik M, Brenner B. Acquired activated protein C resistance is common in cancer patients and is associated with venous thromboembolism. *Am J Med.* 2001; 110: 91–96.
132. NijzielMR, vanOerleR, ChristellaM, ThomassenLGD, vanPampus ECM, Hamulyak K, Tans G, Rosing J. Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients. *Br J Haematol.* 2003; 120: 117–122.
133. Paspatis GA, Sfyridaki A, Papanikolaou N, Triantafyllou K, Livadiotaki A, Kapsoritakis A, Lydataki N. Resistance to activated protein C, factor V leiden and the prothrombin G20210A variant in patients with colorectal cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32: 2–7.
134. Kazmierczak M, Lewandowski K, Wojtukiewicz MZ, Turowiecka Z, Kolacz E, Lojko A, Skrzydlewska E, Zawilska K, Komarnicki M. Cancer procoagulant in patients with adenocarcinomas. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005; 16: 543–547.
135. Otterson GA, Monahan BP, Harold N, Steinberg SM, Frame JN, Kaye FJ. Clinical significance of the FV:Q506 mutation in unselected oncology patients. *Am J Med.* 1996; 101: 406–412.
136. Negaard HF, Iversen PO, Ostenstad B, Mowinckel MC, Sandset PM. Increased acquired activated protein C resistance in unselected patients with hematological malignancies. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(9): 1482-1487.
137. Decousus H, Moulin N, Quenet S, Bost V, Rivron-Guillot K, Laporte S, Mismetti P. Thrombophilia and risk of venous thrombosis in patients with cancer. *Thromb Res.* 2008; 123(1): 187-190.
138. Mitchell LG, Andrew M, Hanna K, Abshire T, Halton J, Anderson R, et al. A prospective cohort study determining the prevalence of thrombotic events in children with acute lymphoblastic leukemia and a central venous line who are treated with L-

asparaginase: results of the Prophylactic Antithrombin Replacement in Kids with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with Asparaginase (PARKAA) Study. *Cancer*. 2003; 97: 508-516.

139. Nowak-Gottl U, Wermes C, Junker R, Koch HG, Schobess R, Fleischhack G, et al. Prospective evaluation of the thrombotic risk in children with acute lymphoblastic leukemia carrying the MTHFR TT 677 genotype, the prothrombin G20210A variant, and further prothrombotic risk factors. *Blood*. 1999; 93: 1595-1599.

140. Wermes C, von Depka Prondzinski M, Lichtinghagen R, Barthels M, Welte K, Sykora K-W. Clinical relevance of genetic risk factors for thrombosis in paediatric oncology patients with central venous catheters. *Eur J Pediatr*. 1999; 158 (Suppl 3): 143-146.

141. Duggan C, Schmidt M, Lawler M *et al*. The prothrombin gene variant G20210A but not factor V Leiden may be associated with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24: 693–694.

142. Ertem M, Akar N. Factor V Leiden mutation as a predisposing factor for veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 1110–1111.

143. Pihusch M, Lohse P, Reitberger J, Hiller E, Andreesen R, Kolb HJ, Holler E, Pihusch R. Impact of thrombophilic gene mutations and graft-versus-host disease on thromboembolic complications after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2004; 78(6): 911-918.

144. Barron MA, Doyle J, Zlotkin S. Vitamin K deficiency in children pre-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37: 151-154.

145. Lee JH, Lee KH, Kim S, et al. Relevance of proteins C and S, antithrombin III, von Willebrand factor, and factor VIII for the development of hepatic veno-occlusive

disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation: A prospective study. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 883–888.

146. Taylor F, Chang A, Ferrell G, Mather T, Catlett R, Blick K, et al. C4b-binding protein exacerbates the host response to *Escherichia coli*. *Blood.* 1991; 78: 357-363.

147. Woywodt A, Haubitz M, Buchholz S, Hertenstein B. Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 34 (12): 1015-1023.

148. Luzzatto G, Cella G, Messina C, Randi ML, Sbarai A, Zanesco L. Markers of endothelial function in pediatric stem cell transplantation for acute leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 2003; 40(1): 9-12.

149. Richard S, Seigneur M, Blann A, Adams R, Renard M, Puntous M, Boiron JM, Amiral J, Reiffers J, Boisseau M. Vascular endothelial lesion in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18(5): 955-959.

150. Park YD, Yasui M, Yoshimoto T, Chayama K, Shimono T, Okamura T, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa-Ha K. Changes in hemostatic parameters in hepatic veno-occlusive disease following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19(9): 915-920.

151. Salat C, Holler E, Kolb HJ, Pihusch R, Reinhardt B, Hiller E. Endothelial cell markers in bone marrow transplant recipients with and without acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19(9): 909-914.

152. Testa S, Manna A, Porcellini A, Maffi F, Morstabilini G, Denti N, Macchi S, Rosti G, Porcellini G, Cassi D, Ferrari L. Increased plasma level of vascular endothelial glycoprotein thrombomodulin as an early indicator of endothelial damage in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18(2): 383-388.

153. Nürnberger W, Michelmann I, Burdach S, Göbel U. Endothelial dysfunction after bone marrow transplantation: increase of soluble thrombomodulin and PAI-1 in patients with multiple transplant-related complications. *Ann Hematol.* 1998; 76(2): 61-65.
154. Catani L, Gugliotta L, Vianelli N, Nocentini F, Baravelli S, Bandini G, Cirio TM, Tura S. Endothelium and bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17(2): 277-280.
155. Borawski J, Naumnik B, Pawlak K, Myśliwiec M. Soluble thrombomodulin is associated with viral hepatitis, blood pressure, and medications in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16(4): 787-792.
156. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med.* 2002; 196(5): 565-577.
157. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Iino S, Taniguchi N, Maruyama I. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest.* 2005; 115(5): 1267-1274.
158. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, Comp P, Russell JA, Cariou A, Um SL, Utterback B, Laterre PF, Dhainaut JF; PROWESS Sepsis Study Group. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. *Crit Care.* 2004; 8(2): 82-90.
159. Borgel D, Bornstain C, Reitsma PH, Lerolle N, Gandrille S, Dali-Ali F, Esmon CT, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. A comparative study of the protein C pathway in

septic and nonseptic patients with organ failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(9): 878-885.

160. Lin SM, Wang YM, Lin HC, Lee KY, Huang CD, Liu CY, Wang CH, Kuo HP. Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 2008; 36(3): 683-689.

THE THROMBOTIC MICROANGIOPATHY IN CHILDREN WITH HIGH RISK ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AFTER ALLO-HSCT: THE REPORT OF 3 CASES.

Dawid Szepecht, Jacek Wachowiak

Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

The 2nd training course on Blood and Marrow Transplantation: a course for paediatricians and paediatric nurses on HSCT in children and adolescent, Genoa, Italy.

Background: Thrombotic microangiopathy (TM) is a life-threatening early complication after hematopoietic stem cells transplantation (HSCT). The incidence of TM is 5% in matched sibling donor HSCT (MSD-HSCT) and up to 15% in matched unrelated donor allogeneic HSCT (MUD-HSCT). The vascular endothelium injury by radiation, chemotherapy and CSA/FK506 may predispose to TM. Mortality is between 15% to 85% and depends on the following risk factors: early onset (before day +120), use of CSA or FK506 and renal or neurological disturbances.

Material and methods: We report cases of 3 children (2 girls, 1 boy) with high risk acute lymphoblastic leukemia (HR-ALL) in 1CR treated according to ALL IC BFM 2002, who underwent allo-HSCT in 2008 and 2009. 2 patients were transplanted with bone marrow cells from MSD (1. girl, age: 6 years, 2. boy, age: 15 years) and 1 patient with peripheral blood stem cells from MUD (girl, age: 10 years). All patients received myeloablative conditioning based on FTBI and VP16. Prior MUD-HSCT, for T cell depletion in vivo, antithymoglobulin i.v. was given. As GvHD prophylaxis CsA was administered after MSD-HSCT and CsA with MTX after MUD-HSCT. Engraftment was achieved in all patients.

TM was diagnosed based on the following clinical manifestations: microangiopathic haemolytic anaemia (anaemia, fragmented cells >4%, increased level of LDH, decreased level of serum haptoglobin, hyperbilirubinaemia), thrombocytopenia, fever of non-infectious origin and renal or neurological disturbances. TM was observed on the following days: +14, +18, +33. In course of TM renal insufficiency was observed in one patient, neurological symptoms were found in one case, renal insufficiency and neurological symptoms also in one child. When TM was diagnosed CSA was discontinued. In two cases administration of mycophenolate mofetil was started. In one patient FK506 was given and was changed into mycophenolate mofetil, when symptoms of TM progressed. In all patients Defibrotide (10 mg/kg q 6h) was administered. aGvHD was developed in all cases before TM on days: +10, +14, +24 and were treated with methylprednisolone at a dose of 2 mg/kg/d. Clinical manifestations of TM receded after CSA/FK506 discontinued and Defibrotide administration started. All children are living, so far.

Conclusions:

1. TM is a severe complication in paediatric SCT. However early diagnosis of TM reduced mortality significantly.
2. Treatment is still controversial. The promising role of Defibrotide needs to be confirmed by prospective studies. Mycophenolate mofetil constitutes forceful prophylaxis of GvHD.
3. Children with ALL might be predisposed to TM.

UKŁAD BIAŁKA C U DZIECI PODDANYCH ALLOGENICZNEJ TRANSPLANTACJI KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH – WYNIKI WSTĘPNE

Dawid Szpecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Jacek Wachowiak¹

¹ Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań,

² Oddział Hematologii, Wielospecjalistyczny Szpital Miejski im. J. Strusia, Poznań

V Zjazd Polskiego Towarzystwa Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Międzyzdroje, 26-29 maja 2010

Wprowadzenie:

Jednym z czynników, który po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych (allo-HSCT) może mieć istotny wpływ na wystąpienie powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonnków jest układ białka C, w skład którego wchodzi: białko C, trombomodulina (białko receptorowe śródbłonna naczyniowego dla trombiny), śródbłonkowy receptor dla białka C i białko S.

Cel:

Ocena aktywności białka C (PC), stężenia wolnego białka S (PS) oraz stężenia trombomoduliny (TR) u dzieci we wczesnym okresie po allo-HSCT.

Material i metody:

Do badania włączono 21 pacjentów (F, n=12 ; M, n=9) w wieku 1-15,5 lat (med. 8 lat) poddanych allo-HSCT (MSD/MUD/MMSD=10/10/1; BM/PBSC/CB=12/7/1). Kondycjonowanie w oparciu o FTBI (n=6), przygotowanie farmakologiczne (n=15). Przed MUD-HSCT dodatkowo podawano ATG *i.v.* (n=10), MMFD-HSCT Campath *i.v.* (n=1). W profilaktyce GvHD po MSD-HSCT stosowano CsA (n=10), po MUD-HSCT CsA+MTX (n=11).

Próbki krwi do badań pobierano w następujących punktach czasowych: przed kondycjonowaniem (A) oraz w dobach 0 (B), +5 (C), +11 (D), +18 (E), +25 (F), +39 (G). Aktywność PC oznaczono metodą chromatogenną, stężenie wolnego PS oraz stężenie TR przy użyciu ELISA. Wartości referencyjne: PC 70-140%, PS >50%, TR 2,73-4,79 ng/ml.

Wyniki:

Wykazano istotne różnice w PS, PC oraz TR w poszczególnych punktach czasowych (ANOVA test, $p<0,0001$). Analiza PC wykazała spadek jego aktywności w punkcie czasowym B w stosunku do punktu A, a następnie stopniowy wzrost, z maksimum w punkcie czasowym G (Tukey post hoc test, A vs F, A vs G, B vs E, B vs F, B vs G, C vs F, C vs G, D vs F, D vs G $p<0,001$). Stężenie wolnego PS osiągnęło minimum w punkcie czasowym C, po czym stopniowo wzrastając, uzyskało wartości sprzed allo-HSCT w punkcie czasowym G (Tukey post hoc test, A vs G, B vs G, C vs G, D vs G $p<0,001$). Dunn's post hoc test wykazał spadek TR od punktu B do D ($p<0,001$), a następnie wzrost od punktu E do G ($p<0,001$; $p<0,05$).

Wnioski:

Kondycjonowanie ma znaczący wpływ na układ białka C (obniżenie aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz trombomoduliny). Powrót do wartości sprzed allo-HSCT następuje do 6 tygodni po transplantacji.

ACTIVATED PROTEIN C RESISTANCE IN CHILDREN WITH THROMBOTIC MICROANGIOPATHY AFTER ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION - PRELIMINARY RESULTS

Dawid Szpecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Jacek Wachowiak¹

¹ Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, Poland

² Department of Hematology J. Strus Hospital, Poznan, Poland

7th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases Working Party, Helsinki, Finlandia, 2-4 czerwiec 2010

Background: Activated protein C resistance (APCR) means inability of protein C to cleave Factor Va and/or Factor VIIIa, which may lead to hypercoagulable state. The best known hereditary form of APCR is Factor V Leiden.

Objective: Analyze in children undergoing allogeneic HSCT (allo-HSCT) the role of APCR in occurrence of HSCT-associated microangiopathy (TAM).

Patients and method: 21 children (median age: 8 years), who between 2008-2009 underwent allo-HSCT (MSD/MUD/MMSD=10/10/1) were included into the study. Diagnosis consisted of ALL (CR1, n=6; CR2, n=2), AML (n=3), biphenotypic acute leukemia (n=3), SAA (n=3), CML (n=2), adrenoleukodystrophy (n=2). Children were conditioned with FTBI-based (n=6) or pharmacological (n=15) regimen. For GvHD prophylaxis CsA was given, plus MTX and ATG in children undergoing MD- or MMSD-HSCT.

Activated protein C (APC) ratio was measured as ratio of activated partial thromboplastin times with and without protein C. APCR was evaluated before conditioning regimen started. Normal range of APC ratio is 2-4. APCR was diagnosed when APC ratio was less than 2. TAM was diagnosed according criteria proposed by Ruutu et al (2007)

Results: Mean APC ratio was 2,61 (range 1.37-3.73). APCR was observed in 4 (19%) patients. TAM was diagnosed in 3 (14%) patients (MSD/MUD=2/1; ALL in CR1, n=2; ALL in CR2, n=1), including 2 out of 4 patients with APCR (Fisher's exact test, *p-value*=0,0286). TAM onset was observed on day + 11, +18, +33. All patients with TAM were conditioned with FTBI and VP16. In 2 patients symptoms of TAM receded after CsA cessation. One child died due to multiorgan dysfunction syndrome.

Conclusions: APCR might be factor of high risk of TAM. In patients with APCR the exclusion of FTBI-based preparative regimen, optimization of GvHD prophylaxis, and TAM prophylaxis should be considered.

THROMBOMODULIN IN CHILDREN WITH THROMBOTIC MICROANGIOPATHY AFTER ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION- PRELIMINARY RESULTS

Dawid Szpecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Jacek Wachowiak¹

¹ Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, Poland

² Department of Hematology J. Strus Hospital, Poznan, Poland

7th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases Working Party, Helsinki, Finlandia, 2-4 czerwiec 2010

Background

Thrombomodulin (TM) is an integral membrane protein expressed on surface of endothelial cells, which acts as cofactor in thrombin-induced activation of protein C anticoagulant pathway. TM is considered as a marker of endothelium injury, but until now it was not investigated in children with HSCT associated thrombotic microangiopathy (TAM).

Objective

Evaluate and compare plasma concentrations of TM in children with and without TAM after allo-HSCT.

Patients and method

Twenty one children (F/M=12/9; median age 8 years, range 1.5-16.5 years), who between 2008-2009 underwent allo-HSCT (MSD/MUD/MMSD=10/10/1; BM/PBSC/CB=12/7/1) were included into the study. TAM was diagnosed according criteria proposed by Ruutu et al (2007) in 3 patients with HR-ALL in CR1 (MSD/MUD=2/1). Blood samples were drawn before conditioning regimen, on day 0, +5, +11, +18, +25, +39, and when TAM was diagnosed. TM-concentration was measured with ELISA (normal range: 2.73-4.79 ng/ml).

Results

Mean TM-concentration varied significantly at all time points (Friedman test, $p<0.0001$). Dunn's post hock comparisons revealed significant ($p<0.001$) decrease of TM from day 0 to +11, and its significant increase ($p<0.001$; $p<0.05$) from day +18 to +39, when TM returned to primary value. Mean TM-concentration in children with TAM, in comparison with that one observed in children without TAM, was lower before conditioning started and on day 0, whilst not significantly higher on day +5, +11, +18, +25, and significantly higher on day +39 (Mann-Whitney test, $p<0.05$).

Conclusions

1. Decreased thrombomodulin concentration in pretransplant period might be factor of high risk of TAM in children undergoing allo-HSCT. 2. In children demonstrating TAM the thrombomodulin concentration is increased and might be marker of HSCT-related endothelium injury. Further assessment of thrombomodulin concentration in children with TAM is warranted to confirm these preliminary observations.

THROMBOMODULIN EARLY AFTER ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION IN CHILDREN CONDITIONED WITH FTBI- VS BUSULPHAN-BASED REGIMEN - PRELIMINARY RESULTS

Dawid Szepecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Ludmila Machowska¹, Jacek Wachowiak¹

¹Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, Poland;

²Department of Hematology J. Strus Hospital, Poznan, Poland

37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Paryż, Francja, 3-6 kwietnia 2011,

Background: Thrombomodulin (TM) acts as cofactor in thrombin-induced activation of protein C anticoagulant pathway. TM is expressed on endothelial cells, and released not only from these last cells, but also from platelets, monocytes, and neutrophils.

Objective: Evaluate and compare TM serum concentrations in children conditioned for allo-HSCT with FTBI or Busulphan (BU) based regimens.

Patients and method: Total of 14 children, who underwent allo-HSCT between 2008-2009 were studied, including 8 (F/M=3/5; median age 8 years, range 1.5-16.5) conditioned with BU-based regimen (MSD/MUD/MMSD=5/2/1; BM/PBSC=5/3), and 6 (F/M=4/2; median age 10.5 years, range 6-15) conditioned with FTBI (MSD/MUD=3/3; BM/PBSC=3/3). As GvHD prophylaxis CsA was given, plus ATG and MTX in children undergoing MUD- or MMSD-HSCT. TM-concentration in serum was measured with ELISA (normal range: 2.73-4.79 ng/ml) before conditioning regimen, and then on day 0, +5, +11, +18, +25, +39.

Results: Before start of preparative regimen both in patients (pts) conditioned with FTBI and BU mean TM concentration was normal, i.e. $4\pm 1,1$ ng/ml and $4,3\pm 1,7$ ng/ml, respectively. Then in each of studied groups the TM concentration decreased significantly from day 0 (FTBI: $2,3\pm 1,5$ ng/ml; BU: $1,4\pm 1,1$ ng/ml) to day +11 (FTBI: $1,2\pm 2$ ng/ml; BU: $0,45\pm 0,6$ ng/ml), when the nadir was observed, and started to increase significantly from day +18 (FTBI: $3,1\pm 2,8$ ng/ml; BU: $3,7\pm 3,6$ ng/ml) up to its primary values on day +39 (FTBI: $6,4\pm 4$ ng/ml; BU: $4,2\pm 2$ ng/ml). Mean TM-concentration on day 0 was significantly lower in pts conditioned with BU-based regimen than in those conditioned with FTBI ($p<0.05$).

Conclusions: 1. Both in children conditioned for allo-HSCT with FTBI- and with BU-based preparative regimens significant decrease of TM serum concentration is observed within first 2 weeks after transplantation with subsequent return to primary TM concentrations within next 3 week. 2. On day 0 the decrease of TM serum concentration is significantly more pronounced in children conditioned with BU-based preparative regimens. 3. Significant decrease of TM serum concentration observed within first 2 weeks after allo-HSCT may contribute to impaired activation of protein C anticoagulant pathway, and thus to pathogenesis of early post-transplant coagulopathy and endothelial complications.

PROTEIN C IN CHILDREN WITH EARLY COMPLICATION AFTER ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION

Dawid Szpecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Jacek Wachowiak¹

¹ Department of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, Poland

² Department of Hematology J. Strus Hospital, Poznan, Poland

XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasi, Kyoto, Japonia, 23-28 lipiec 2011

Decreased of protein C (PC) activity was seen following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) creating a hypercoagulable state. PC acts on cells to exert multiple cytoprotective effects, including: alteration of gene expression, antiinflammatory and antiapoptotic activity and endothelial barrier stabilization. Some of early complications (EC) of alloHSCT are associated with endothelium injury caused by chemo- and radiotherapy.

Objective: Evaluate and compare PC activity in children with EC of alloHSCT and associated with endothelium injury: thrombotic microangiopathy (TAM), capillary leak syndrome (CLS) and veno-occlusive disease (VOD).

Patients and method: Total of 35 patients (pts) (female/male=16/19; median age 8.9 years, range 1.7-17.1 years), who underwent alloHSCT (MSD/MUD/MMFD=15/18/2) between 2008-2010 were included prospectively study. As GvHD prophylaxis CsA was given, plus ATG and methotrexate in children undergoing MUD- or MMSD-HSCT.

TAM was diagnosed according criteria proposed by Ruutu et al (2007) in 3 pts with ALL, CLS based on EBMT Handbook (2008) in 3 pts with AML. VOD was not observed.

Control group (CG) constitutes 6 pts without any complications in posttransplant period.

PC activity was measured by chromogenic assays (normal range: 70%-140%) before conditioning regimen, and then on day 0, +5, +11, +18, +25, +39.

Results: Before start of preparative regimen both in pts with EC and CG mean PC activity was normal, i.e. 97,4±42,3% and 92,6±26,6%, respectively. Then in EC group the PC activity decreased from day 0 (EC: 78±22,3%; CG: 91,9±16,2%) with nadir on day +5 (EC: 68,3±29,9%; CG: 118±47,4%) and started to increase from day +11 (EC: 93,9±52,2%; CG: 117,7±49,7%) up to values on day +39 (EC: 129,9±58,7%; CG: 136,8±49,5%). Mean PC activity on day +5 was significantly lower in pts with EC than in CG (p=0.041).

Conclusions: PC activity below normal ranges is observed in first week after alloHSCT and just in recipients with CLS and TAM and may be associated with losing PC ability to stabilize endothelium and may play important role in etiopathogenesis of early complications associated with endothelium injury after alloHSCT.

UKŁAD BIAŁKA C WE WCZESNYCH POWIKŁANIACH ZWIĄZANYCH Z USZKODZENIEM ŚRÓDBŁONKÓW U DZIECI PODDANYCH ALLOGENICZNEJ TRANSPLANTACJI KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

Dawid Szpecht¹, Jolanta Kurosz², Jerzy Jaworski², Aleksandra Redgos², Krystyna Zawilska², Jacek Wachowiak¹

- 1 Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
- 2 Oddział Hematologii, Wielospecjalistyczny Szpital Miejski im. J. Strusia, Poznań

XXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, 16-18 września 2011, Lublin

Wprowadzenie:

Układ białka C, w skład którego wchodzi białko C (PC), trombomodulina (TM), śródbłonkowy receptor dla białka C i białko S (PS) może mieć istotny wpływ na występowanie powikłań związanych z uszkodzeniem śródbłonków po allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych (allo-HSCT).

Cel:

Ocena aktywności PC, stężenia wolnego PS oraz stężenia rozpuszczalnej trombomoduliny (sTM) u dzieci z mikroangiopatią zakrzepową (TAM), zespołem przesiąkania włosniczek (CLS) oraz chorobą okluzyjną żył wątrobowych (VOD).

Material i metody:

Wśród 29 dzieci w wieku 1,7-17,1 lat (mediana 8,9 lat) włączonych prospektywnie do badania u 3 (10,3%) rozpoznano TAM pacjentów, a u 3 (10,3%) CLS. VOD nie wystąpiła w badanej grupie. Grupę kontrolną stanowili pacjenci (n=6), u których nie stwierdzono wczesnych powikłań allo-HSCT.

Krew do badań pobierano przed kondycjonowaniem i w dniach 0, +5, +11, +18, +25, +39 oraz dodatkowo w chwili rozpoznania powikłania i po stwierdzeniu ustępowania lub progresji jego objawów. Wartości referencyjne wynosiły: PC 70-140%, PS >50%, sTM 2,73-4,79 ng/ml.

Wyniki:

U pacjentów z CLS i TAM aktywność PC w dobie +5 (68,3%±29,9%), stężenie wolnego PS w dobie +11 (65,5%±17,2%) były znacząco niższe w stosunku do odpowiednich wartości spostrzeganych w grupie kontrolnej (p=0,041). Aktywność PC (77,4±40,8%) i stężenie wolnego PS (53,8±20,4%) znacząco wzrastały po zakończeniu leczenia CLS i TAM (PC: 122,8±42,9%, PS: 91,6±24,6%). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic stężeń sTM u pacjentów z CLS i TAM w porównaniu z grupą kontrolną.

Wnioski:

U dzieci z TAM i CLS po allo-HSCT obserwuje się obniżenie aktywności białka C, stężenia wolnego białka S oraz rozpuszczalnej trombomoduliny. U dzieci bez tych powikłań zmian w zakresie układu białka C nie spostrzegano.