

Anna Kiziewicz¹, Ewa Żekanowska¹, Krzysztof Cieśliński², Krzysztof Góralczyk³

¹Zakład Zaburzeń Hemostazy Katedry Patofizjologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: dr hab. med. Ewa Żekanowska, prof. UMK

²Oddział Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, Kujawsko-Pomorskie Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy
Ordynator: dr med. Krzysztof Cieśliński

³Katedra Patofizjologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik katedry: dr hab. med. Danuta Rość, prof. UMK

Układ białka C u chorych na samoistne włóknienie płuc — obserwacje wstępne

Protein C system in patients with idiopathic pulmonary fibrosis — preliminary report

Abstract

Introduction: The natural anticoagulant — activated protein C system plays an important role in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. The purpose of this study was to evaluate the concentration of protein C (PC), protein S (PS), thrombomodulin (TM), selectin E (sSelE), and thrombin–antithrombin complex (TAT) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

Material and methods: Study group consisted of 11 patients aged 51.5 ± 8.62 years with idiopathic pulmonary fibrosis and 20 healthy adults as control. Concentration of PC, PS, TM, sSelE and TAT in plasma with ELISA method was assessed.

Results: We observed significantly lower plasma concentration of PC ($98.24 \pm 16.17\%$ vs. $130.59 \pm 19.03\%$), PS ($71.31 \pm 12.95\%$ vs. $93.47 \pm 18.63\%$), TM (2.67 ± 0.40 ng/ml vs. 3.99 ± 1.16 ng/ml) and significantly higher level of TAT complex (Me = 4.00 mg/ml vs. 2.20 mg/ml) and sSelE (Me = 36.40 ng/ml vs. 22.84 ng/ml) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis as compared to controls.

Conclusion: In presented pilot study we observed decreased activity of protein C system and increased thrombin generation in peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, activated protein C, complex TAT

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 225–228

Streszczenie

Wstęp: Układ białka C to naturalny układ antytrombogenny, który może odgrywać istotną rolę w procesie samoistnego włóknienia płuc. Celem pracy było oznaczenie stężenia białka C (PC), białka S (PS), trombomoduliny (TM), selektyny E (sSelE) i kompleksu trombina–antytrombina (TAT) w osoczu krwi chorych na samoistne włóknienie płuc.

Material i metody: Grupa badanych obejmowała 11 chorych na samoistne włóknienie płuc (średnia wieku $51,5 \pm 8,62$ r.). Rozpoznanie ustalono na podstawie objawów klinicznych, badań czynnościowych, radiologicznych, u wszystkich chorych przeprowadzono biopsję otwartą płuca. Grupa kontrolna obejmowała 20 zdrowych ochotników, pierwszorazowych dawców krwi. W osoczu oznaczono stężenie PC, PS, TM, sSelE i TAT metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki: U chorych na samoistne włóknienie płuc zaobserwowano istotnie obniżone stężenia PC ($98,24 \pm 16,17\%$ vs. $130,59 \pm 19,03\%$), PS ($71,31 \pm 12,95\%$ vs. $93,47 \pm 18,63\%$), TM ($2,67 \pm 0,40$ ng/ml vs. $3,99 \pm 1,16$ ng/ml) oraz istotnie wyższe stężenie kompleksu TAT (Me = 4,00 mg/ml vs. 2,20 mg/ml) oraz sSelE (Me = 36,40 ng/ml vs. 22,84 ng/ml) w porównaniu z grupą kontrolną.

Wniosek: Wstępne obserwacje wskazują, że we krwi chorych na samoistne włóknienie płuc występuje obniżenie potencjału antykoagulacyjnego układu białka C, które może być konsekwencją nasilonej wewnątrznaczyniowej aktywacji procesu krzepnięcia krwi.

Słowa kluczowe: samoistne włóknienie płuc, układ białka C, kompleks TAT

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 225–228

Adres do korespondencji: Anna Kiziewicz, Zakład Zaburzeń Hemostazy, Katedra Patofizjologii *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz, tel.: (052) 585 35 91, e-mail: kizpatofiz@cm.umk.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 3.07.2007 r.
Copyright © 2008 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wstęp

Obecnie uważa się, że w patomechanizmie samoistnego włóknienia płuc kluczową rolę odgrywają takie procesy, jak: uszkodzenie śródbłonka naczyń i nabłonka pęcherzyków płucnych, proliferacja komórek mezenchymy i włóknienie. Czynniki wywołujące tego typu ostre uszkodzenia pozostaje nadal niezidentyfikowany.

W wyniku uszkodzenia bariery nabłonkowo-śródbłonkowej i jej nieszczelności dochodzi do przenikania białek układu hemostazy do przestrzeni pozanaczyniowej, gdzie gromadzą się w dużym stężeniu czynniki krzepnięcia i fibrylizacji [1–3]. Cytokiny uwalniane z komórek zaangażowanych w proces zapalny powodują aktywację procesu krzepnięcia krwi i prowadzą do zmian zarówno w hemostazie wewnątrznaczyniowej, jak i miąższu płuc. Priorytetową rolę w aktywacji krzepnięcia krwi u chorych na samoistne włóknienie płuc odgrywa czynnik tkankowy (TF, *tissue factor*), którego wzmożona ekspresja obserwowana jest zarówno we krwi, jak i w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym [4, 5]. Mediatorzy procesu zapalnego, takie jak płytkowy czynnik wzrostu B (PDGF, *platelet derived growth factor B*), czynniki różnicowania wzrostu (TGF- α , β , *transforming growth factor α , β*), interleukiny IL-1 i IL-8, czynnik martwicy nowotworu (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), indukują w komórkach śródbłonka naczyniowego, komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych oraz makrofagach ekspresję TF, co prowadzi do aktywacji układu krzepnięcia, generacji trombiny i powstania złożeń włóknika [6, 7].

W warunkach fizjologicznych nadmiernemu odkładaniu się włóknika może przeciwdziałać sprawnie działający system antykoagulacyjny białka C [8]. Do zapewnienia fizjologicznej funkcji tego układu niezbędne są następujące czynniki: białko C (PC, *protein C*) i białko S (PS, *protein S*), trombomodulina (TM, *thrombomodulin*), śródbłonkowy receptor dla białka C (EPCR, *endothelial protein C receptor*) i inhibitor białka C (PCI, *protein C inhibitor*). Kompleks trombomodulina–trombina przy udziale białka S jako kofaktora reakcji aktywuje białko C, które następnie degradowuje aktywne formy V i VIII czynnika krzepnięcia [8, 9].

Do pełnej aktywacji układu białka C wymaga jest obecność trombomoduliny, która jest naturalnym antykoagulantem, obecnym na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego. Podobnie jak selektyna E (sSeLE, *selectin E*), TM jest uwalniana do krążenia z aktywowanych lub uszkodzonych komórek śródbłonka naczyniowego pod

wpływem takich czynników, jak: toksyny bakteryjne, hipoksja, cytokiny zapalne [10].

Celem pracy była ocena układu białka C na tle wybranych parametrów krzepnięcia krwi u chorych na samoistne włóknienie płuc.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w grupie 11 chorych na samoistne włóknienie płuc w wieku $51,5 \pm 8,6$ roku (9 mężczyzn i 2 kobiety) zakwalifikowanych do leczenia w Kujawsko-Pomorskim Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy. Rozpoznanie ustalono na podstawie objawów klinicznych, badań czynnościowych, radiologicznych, u wszystkich chorych przeprowadzono biopsję otwartą płuca. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych mężczyzn, pierwszorazowych dawców krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa w Bydgoszczy w podobnym wieku co osoby z grupy badanej. Protokół badania zaakceptowała Komisja Bioetyczna. Wszyscy pacjenci oraz osoby z grupy kontrolnej wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu.

Materiałem do badań była krew pobierana od pacjentów przed rozpoczęciem leczenia w godzinach porannych, z czystego nakłucia żyły odłokciowej, do probówki zawierającej 3,2% cytrynianu sodu w proporcji: 9 ml krwi + 1 ml cytrynianu sodowego. Stężenie trombomoduliny, białka C, białka S, kompleksu trombina–antytrombina oraz selektyny E oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA (testy: TM-IMUBIND trombomodulin ELISA Kit, American Diagnostica, PC, PS-ASSERACHROM PROTEIN C, S Diagnostica Stago, Roche). U chorych na samoistne włóknienie płuc oceniono również poziom kompleksów trombina–antytrombina (TAT) jako markera procesu trombinogenezy *in vivo* oraz dokonano pomiaru rozpuszczalnej formy selektyny E, którą uznaje się za marker pobudzenia i/lub uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego (TAT+Enzygnost TAT, Dade Behring, selektyna E — Bender Med. Systems).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu statystycznego STATISTICA for Windows firmy StatSoft. Do oceny różnic między grupami zastosowano test *t*-Studenta oraz test U Manna-Whitneya, uznając poziom istotności $p \leq 0,05$ za statystycznie istotny. Białko C, S oraz trombomodulina charakteryzują się rozkładem zbliżonym do normalnego ($X \pm SD$), natomiast selektyna E oraz kompleks TAT — różnym od normalnego, dlatego ich zmienność przedstawiono w postaci mediany (Me) i kwartyli (Q1 i Q3).

Tabela 1. Stężenie białka C, białka S i trombomoduliny w osoczu chorych na samoistne włóknienie płuc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych

Table 1. The concentration of protein C, protein S and thrombomodulin in plasma of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (examined group) compared to control group

	Grupa badana <i>Examined group</i> X ± SD	Grupa kontrolna <i>Control group</i> X ± SD	p
PC [%]	98,24 ± 16,17	130,59 ± 19,03	0,00005
PS [%]	71,31 ± 12,95	93,47 ± 18,63	0,00072
TM [ng/ml]	2,67 ± 0,40	3,99 ± 1,16	0,00001

SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; PC (*protein C*) — białko C; PS (*protein S*) — białko S; TM (*thrombomodulin*) — trombomodulina

Wyniki

Średnie stężenie PC, PS oraz TM było u chorych na samoistne włóknienie płuc znamienne statystycznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1).

Wykazano też, że stężenie kompleksu TAT było znamienne statystycznie wyższe u pacjentów z samoistnym włóknieniem płuc w porównaniu z grupą kontrolną, co świadczy o nasilonym wytwarzaniu trombiny. U chorych na samoistne włóknienie płuc stężenie selektyny E było znamienne podwyższone w porównaniu z osobami zdrowymi (tab. 2).

Omówienie

W badaniach własnych u wszystkich chorych na samoistne włóknienie płuc stwierdzono, że stężenie białka C było istotnie statystycznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną (98,24 ± 16,17% vs. 130,59 ± 19,03%). Jednak wartości te pozostawały w zakresie normy fizjologicznej (70–140%). Kobayashi i wsp. [11] badali w osoczu i płynie oskrzelowo-pęcherzykowym (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) u chorych na samoistne włóknienie płuc stężenie białka C i wykazali między innymi, że stężenie osoczkowego PC u tych chorych było porównywalne z grupą kontrolną. Natomiast stężenie białka C w BALF było istotnie wyższe, jednak wartość wskaźnika APC-PCI/PC (*activated PC-PC inhibitor/PC*) była znamienne statystycznie niższa, co wskazuje na obniżenie aktywności układu białka C w BALF.

Stężenie białka S u badanych przez nas chorych było podobne jak białka C, znamienne statystycznie niższe u chorych na samoistne włóknienie

Tabela 2. Stężenie kompleksu trombina–antytrombina oraz selektyny E w osoczu chorych na samoistne włóknienie płuc w porównaniu z grupą kontrolną

Table 2. The concentration of thrombin–antithrombin complex and selectin E in plasma of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (examined group) compared to control group

	Grupa badana <i>Examined group</i> Me Q1; Q3		Grupa kontrolna <i>Control group</i> Me Q1; Q3		p
TAT [mg/ml]	4,00	1,90; 5,70	2,20	2,10; 2,60	0,01
Sel E [ng/ml]	36,40	19,78; 44,95	22,84	19,26; 34,76	0,02

Sel E (*selectin E*) — selektyna E; TAT (*thrombin–antithrombin*) — kompleks trombina–antytrombina; Me — mediana; Q1 — kwartyl 1; Q3 — kwartyl 3

nie płuc w stosunku do osób zdrowych (71,31 ± 12,95% vs. 93,47 ± 18,63%) i pozostawało na dolnej granicy wartości fizjologicznych.

Do aktywacji układu białka C obok białka S niezbędna jest trombomodulina. W badaniach własnych autorzy wykazali, że stężenie TM w osoczu chorych na samoistne włóknienie płuc było znamienne statystycznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną (2,67 ± 0,40 ng/ml vs. 3,99 ± 1,16 ng/ml).

Komórki śródbłonna różnych organów i tkanek cechuje znaczna heterogenność ekspresji TM, co zależy od stopnia ich unaczynienia. Miąższ płuc i serce wykazują podobną ekspresję trombomoduliny, natomiast naczynia krwionośne mózgu są jej niemalże pozbawione [10].

Nieliczne badania dotyczą stężenia trombomoduliny u chorych na samoistne włóknienie płuc. Iguchi i wsp. oznaczali stężenie TM we krwi i w moczu u chorych na samoistne włóknienie płuc. Badacze ci wykazali, że stężenie TM we krwi jest podobne do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, natomiast wartości oznaczane w moczu były znamienne statystycznie wyższe niż u osób zdrowych [12].

Trombomodulina jest białkiem modulującym właściwości trombiny. Trombina po związaniu z TM traci zdolność do przekształcania fibrynogenu w fibrynę, aktywacji osoczkowych czynników krzepnięcia i płytek krwi. Powstały kompleks trombina–trombomodulina aktywuje układ białka C oraz wpływa na regulację układu fibrynolitycznego poprzez hamowanie aktywności PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*), jak również aktywację nowo odkrytego inhibitora fibrynolizy TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) [10].

Fujimoto i wsp. [13, 14] wykazali znamienne podwyższone stężenie TAFI, zarówno w osoczu, jak i w BALF, u chorych na samoistne włóknienie płuc w porównaniu z grupą kontrolną. TAFI może

być jednym z czynników odpowiedzialnych za upośledzenie aktywności fibrynolitycznej obserwowane u tych chorych. Wykazany w badaniach własnych obniżony poziom TM może być zatem wynikiem jej zużycia w procesie aktywacji układu białka C, jak również aktywacji TAFI.

Oprócz oceny TM przeprowadzono również ocenę rozpuszczalnej formy selektyny E, uznawanej za biochemiczny marker aktywacji lub uszkodzenia śródbłonna naczyniowego. U chorych na samoistne włóknienie płuc stwierdzono jej znamienne statystycznie wyższe stężenie w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki badań własnych autorów są zgodne z obserwacjami Hayashi i wsp. [15], którzy również stwierdzili podwyższone stężenie selektyny E u chorych na samoistne włóknienie płuc. Autorzy ci stwierdzili znamienne statystycznie dodatnią korelację między poziomem rozpuszczalnej formy sSelE a poziomem SP-A (*surfactant apoprotein-A*) i wskazują na diagnostyczną użyteczność pomiaru sSelE w ocenie aktywności procesu włóknienia.

Autorzy niniejszego artykułu wykazali w badaniach własnych u chorych na samoistne włóknienie płuc obok obniżonego potencjału antykoagulacyjnego białka C wzmożone wytwarzanie trombiny, o czym świadczyło podwyższone stężenie kompleksów trombina–antytrombina. Obserwacje własne są zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy również stwierdzili u tych chorych wzmożone wewnątrznacyniowe wytwarzanie trombiny [11, 13]. Wytworzona trombina jest czynnikiem stymulującym ekspresję cytokin prozapalnych, syntezę kolagenu oraz bierze udział w migracji i proliferacji fibroblastów [4, 16].

Obniżone wartości białka C i S oraz trombomoduliny obserwowane u chorych na samoistne włóknienie płuc wskazują na wyraźne obniżenie potencjału antykoagulacyjnego, co może wiązać się ze zużyciem się tych czynników w procesie hamowania odkładania się włókna w śródmiąższu płuc. Przedstawione wyniki mają charakter wstępny i wymagają dalszych badań na szerszym materiale klinicznym.

Wnioski

U chorych na samoistne włóknienie płuc obserwuje się zaburzenia w hemostazie wewnątrznacyniowej związane z uszkodzeniem śródbłonna naczyniowego, wzmożone wytwarzanie trombiny oraz obniżenie potencjału antykoagulacyjnego układu białka C.

Piśmiennictwo

1. American Thoracic Society ATS, European Respiratory Society ERS. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2002; 165: 227–304.
2. Geiser T. Idiopathic pulmonary fibrosis — a disorder of alveolar wound repair. *Swiss. Med. Wkly.* 2003; 133: 405–411.
3. Wesołowski S. Rola badań czynnościowych w rozpoznawaniu, monitorowaniu przebiegu i określeniu rokowania w samoistnym włóknieniu płuc. Rozprawa habilitacyjna. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 1–52.
4. Tałataj J., Chyczewska E. Krzepnięcie i fibrylizacja w śródmiąższowych chorobach płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1999; 67: 146–150.
5. Kowal K., Kemona-Chętnik I., Kucharewicz I., Bodziana-Lukaszyk A. Układ krzepnięcia w zapalnych chorobach płuc. *Pol. Arch. Med. Wew.* 2003; 110: 775–779.
6. Chyczewska E., Chyczewski L., Barczyk M. i wsp. Morfologia komórek tucznych w doświadczalnym włóknieniu płuc wywołanym przez bleomycynę. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1995; 63 (supl. 2): 87–92.
7. Gołacki M., Jankowska R. Choroby śródmiąższowe płuc — współczesne poglądy na immunopatogenezę. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005; 14: 171–174.
8. Esmon C.T. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb. Haemost.* 1993; 70: 29–35.
9. Esmon C.T. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 51–56.
10. Van de Wouwer M., Collen D., Conway E.M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1374–1383.
11. Kobayashi H., Gabazza E.C., Taguchi O. i wsp. Protein C Anticoagulant system in patients with interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1998; 157: 1850–1885.
12. Iguchi M., Goto H., Goto M., Shinno H. Urine thrombomodulin in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1998; 113: 849.
13. Fujimoto H., Gabazza E. C., Hataji O. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and protein C inhibitor in interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 1687–1694.
14. Fujimoto H., Gabazza E. C., Taguchi O. i wsp. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency attenuates bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2006; 168: 1086–1096.
15. Hayashi S., Abe K., Matsuoka H. i wsp. Increased Level of Soluble E-Selectin in the Serum from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Inflammation* 2004; 28: 1–5.
16. Welty-Wolf K.E., Carraway M.S., Ortel T.L., Piantadosi C.A. Coagulation and inflammation in acute lung injury. *Thromb. Haemost.* 2002; 88: 17–25.