

Gdański Uniwersytet Medyczny

Marcin Paweł Hennig

**Ocena wybranych czynników krzepnięcia u dzieci ze
złośliwymi nowotworami w powiązaniu z przebiegiem
klinicznym schorzenia**

Rozprawa doktorska

Promotor: Dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii

Gdańsk 2015

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY	5
WSTĘP	8
I. Fizjologia układu krzepnięcia i fibrynolizy	8
II. Laboratoryjne wskaźniki układu krzepnięcia.....	12
III. Patofizjologia oddziaływania choroby nowotworowej na układ krzepnięcia.....	13
IV. Manifestacja kliniczna stanów prozakrzepowych.	14
1. Trombofilia.....	14
2. Żyłna Choroba Zakrzepowo-Zatorowa.....	15
V. Zakrzepica w chorobie nowotworowej.....	17
1. Obraz kliniczny zakrzepicy.....	17
2. Terapia nowotworowa.....	19
3. Rola centralnych cewników naczyniowych.....	19
VI. Terapia powikłań zakrzepowych choroby nowotworowej.....	22
VII. Udział układu krzepnięcia w stymulacji rozwoju choroby nowotworowej.....	23
CEL PRACY	27
MATERIAŁY I METODY	28
I. Charakterystyka grupy badanej	28
II. Materiał do badań.....	33
1. Historie choroby pacjentów włączonych do badania.....	33
2. Krew obwodowa.....	33
3. Materiał tkankowy.....	33
III. Metodyka badań.....	33
1. Ocena hemostazy.....	33
2. Oznaczenia czynnika tkankowego (TF) metodą ELISA.....	35
3. Badania patomorfologiczne	37
4. Badania immunohistochemiczne	37
4a. Analiza immunohistochemiczna wybranych markerów tkankowych.....	38

5. Metody statystyczne.....	40
WYNIKI	41
I. Analiza materiału klinicznego.....	41
II. Analiza wskaźników laboratoryjnych.....	41
1. Płytki krwi.....	41
2. Wskaźnik protrombinowy.....	44
3. INR.....	45
4. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT).....	45
5. Fibrynogen.....	46
6. D-dimer.....	47
7. Antytrombina III.....	48
A. Analiza parametrów krzepnięcia w zależności od rozpoznania histopatologicznego.....	49
1. Płytki krwi.....	50
2. Wskaźnik protrombinowy.....	50
3. Fibrynogen.....	52
B. Porównanie parametrów krzepnięcia u dzieci z pierwotnym zachorowaniem i we wznowie choroby nowotworowej.	53
1. Płytki krwi.....	53
2. Wskaźnik protrombinowy.....	54
3. Fibrynogen.....	54
4. D-dimer.....	55
C. Analiza parametrów krzepnięcia u dzieci w zależności od stadium choroby.	57
1. Płytki krwi.....	57
2. Wskaźnik protrombinowy.....	57
3. INR.....	58
4. Fibrynogen.....	59
5. D-dimer.....	60
D. Parametry krzepnięcia w surowicy krwi w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie onkologiczne.	61
1. Płytki krwi.....	61
2. Wskaźnik protrombinowy.....	62
3. INR.....	63

4. Fibrynogen.....	64
5. D-dimer.....	65
6. Antytrombina III.....	66
III. Stężenie czynnika tkankowego (TF) w surowicy krwi.	68
1. Stężenia TF w surowicy przed i po leczeniu onkologicznym.	68
2. Stężenie TF w surowicy krwi w zależności od rozpoznania histopatologicznego	68
3. Stężenie TF u dzieci ze wznową i w grupie z pierwotnym zachorowaniem.....	69
4. Stężenie TF w surowicy w zależności od stadium zaawansowania choroby.....	70
5. Stężenie TF w surowicy w zależności od odpowiedzi na leczenie.....	71
IV. Badania immunohistochemiczne wybranych czynników krzepnięcia w tkankach nowotworowych.	73
1. Dokumentacja fotograficzna	73
2. Odczyny immunohistochemiczne w komórkach nowotworowych.....	80
3. Odczyny immunohistochemiczne w naczyniach nowotworowych.	82
DYSKUSJA.....	85
1. Laboratoryjne wskaźniki układu krzepnięcia.....	86
2. Stężenie czynnika tkankowego w surowicy krwi.....	91
3. Wskaźniki układu krzepnięcia w tkankach nowotworowych	94
4. Podsumowanie	97
WNIOSKI	100
STRESZCZENIE.....	101
ABSTRACT.....	103
PIŚMIENNICTWO	105

WYKAZ SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY

ALAT - transaminaza alaninowa

ALL - ostra białaczka limfo blastyczna

AML - ostra białaczka szpikowa

APTT - czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

ASPAT - transaminaza asparaginowa

AT III - antytrombina III

CD 31 - płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej

CP – prokoagulant nowotworowy C

CR - całkowita remisja

CVL - centralny cewnik naczyniowy

DAB – diaminobenzydyna

DIC - rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe

DVT - zakrzepica żył głębokich

EDRF – ang. endothelial derived relaxing factor

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu

ELISA - ang. enzyme-linked immunosorbent assai test immunoenzymatyczny

FVIIIa – aktywowany czynnik antyhemofilowy VIII

GCT - nowotwór germinalny

GUMed – Gdański Uniwersytet Medyczny

HBL - wątrobiak zarodkowy

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C

HD - chłoniak Hodgkina

H-E - barwienie hematoksyliną- eozyną

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności

IHC – immunohistochemiczne

IL-1 – interleukina 1

IL-11 – interleukina 11

IL-6 – interleukina 6

INR - standaryzowany współczynnik międzynarodowy

K2EDTA - wersenian sodowo-dwupotasowy

L-ASPA - L-asparaginaza

LMWH - heparyna drobnocząsteczkowa

MTM - mięsak tkanek miękkich

MVD - gęstość naczyń mikrokrażenia

N – norma laboratoryjna

NBL - zwojak zarodkowy współczulny

NHL -chłoniak nieziarniczych

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PAI-1 - inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu

PLT – płytki krwi

PT - czas protrombinowy

RMSA - mięsak prążkowanokomórkowy typ pęcherzykowy

RMSE - mięsak prążkowanokomórkowy typ płodowy

SD – odchylenie standardowe

SIOP – fran. Societe International d’Oncologie Pediatrique, Międzynarodowe Towarzystwo
Pediatrików Onkologów

SP - koniugat enzymatyczny Streptawidyna-Peroksydaza

TF - czynnik tkankowy

TFPI - inhibitor zależnej od czynnika tkankowego zewnątrzpoходnej drogi krzepnięcia

TMB - tetrametylo-benzydyna

TNF – czynnik martwicy nowotworów

t-PA - tkankowy aktywator plazminogenu

TT – czas trombinowy

UCK – Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku

UFH - heparyna niefrakcjonowana

VEGF - naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu

VKA - antagoniści witaminy K

VOD - choroba wenookluzyjna wątroby

vWF - czynnik von Willebranda

ZP - zatorowość płucna

ŻChZZ - Żyłna Choroba Zakrzepowo-Zatorowa

Wstęp

I. Fizjologia układu krzepnięcia i fibrynolizy.

Układ hemostazy odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy całego ustroju. Jego głównymi składowymi są: płytki krwi, czynniki układu krzepnięcia, czynniki układu fibrynolizy i prawidłowa struktura naczyń krwionośnych. Wszystkie te czynniki dla utrzymania równowagi hemostatycznej funkcjonują w ustroju jednocześnie, wzajemnie na siebie oddziałując (1). Hemostaza warunkuje utrzymanie płynności krążącej krwi, a w sytuacji uszkodzenia struktury naczynia zabezpiecza jego spójność, wytwarzając skrzep. Mechanizmy hemostatyczne wpływają następnie na ograniczenie procesu krzepnięcia, rekanalizację naczynia i przywrócenie prawidłowego w nim krążenia. Płynność krwi jest warunkowana przez:

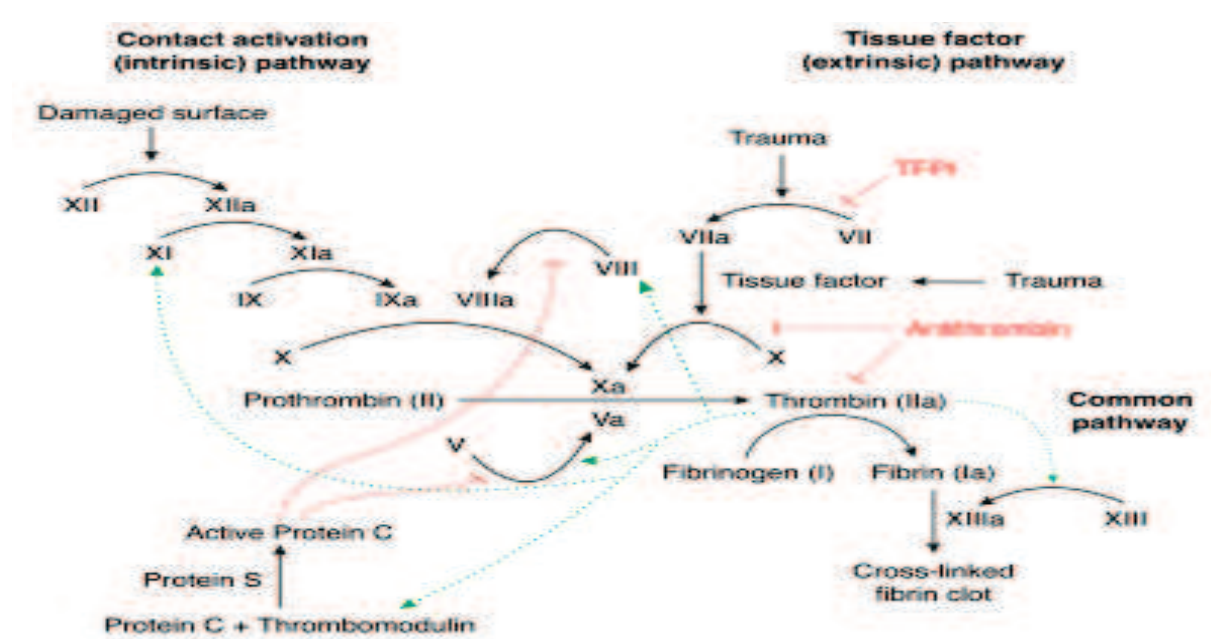
- ujemnie zgodne ładunki elektryczne między ścianą naczynia – śródbłonkiem i płytkami krwi
- produkcję i wydzielanie przez śródbłonek: prostacykliny i czynnika EDRF (endotelial derived relaxing factor), substancji hamujących aktywację płytek i działających miorelaksacyjnie na ścianę naczynia
- utrzymanie osoczowych czynników krzepnięcia w formie nieaktywnych białek, wymagających proteolizy dla pełnego działania,
- obecność naturalnych blokerów krzepnięcia (2).

Wstępną reakcją organizmu na przerwanie ciągłości naczynia i pojawienie się krwawienia, jest utworzenie „płytkowego czopu” w wyniku oddziaływania płytek krwi z elementami uszkodzonej ściany naczynia. Jest to tzw. **hemostaza pierwotna**. Zaburzenia hemostazy pierwotnej występują w przypadku ilościowych lub jakościowych zaburzeń płytek krwi (trombocytopatie) albo w przypadku wad naczyniowych. Klinikzną manifestacją tych zaburzeń jest występowanie skazy płytkowej lub naczyniowej.

Prawidłową reakcją po przerwaniu ciągłości naczynia jest obkurczenie się i zmiana napięcia elektrycznego ściany naczynia. Odsłonięty kolagen prezentując ładunek dodatni przyciąga trombocyty. Płytki krwi gromadzą się i przylegają do śródbłonka naczyniowego, a następnie przy współudziale pochodzącego ze śródbłonka czynnika von Willebranda (vWF) i fibrynogenu, podlegają aktywacji i uwalniają swą zawartość (3). Stopniowe zwiększenie liczby zaangażowanych w proces hemostazy płytek, powoduje wzrost objętości skrzepu pierwotnego. Powstała struktura jest wysoce niestabilna i ma charakter przejściowy. Dla utrwalenia skrzepu pierwotnego niezbędna jest aktywacja mechanizmów związanych z

hemostazą osocзовą, czyli tzw. „kaskady krzepnięcia”. Dopiero ten mechanizm zapewnia powstanie struktury stabilizującej i utrwalającej skrzep – włóknika. Jest to etap **hemostazy wtórnej**. Włóknik wiąże czop płytkowy, przytwierdza go do ściany uszkodzonego naczynia oraz uaktywnia i podtrzymuje kaskadę krzepnięcia. Istotę jej prawidłowego funkcjonowania stanowią dwa mechanizmy: pobudzania i ograniczania procesu krzepnięcia. Pierwszy polega na dynamicznym aktywowaniu kolejnych czynników krzepnięcia we wzrastającym natężeniu. W drugim, niestabilność uaktywnionych czynników krzepnięcia sprawia, że są one wykorzystywane jedynie w miejscu ich aktywacji i w warunkach fizjologicznych nie dochodzi do szerokiego rozprzestrzenienia się powstającego skrzepu (4).

Według obowiązującej koncepcji funkcjonowania układu krzepnięcia istnieją dwa tory aktywacji krzepnięcia. Dominującą rolę odgrywa **tor zewnątrzpochodny**. Jest on indukowany pierwotną reakcją na uszkodzenie naczynia krwionośnego. Tor wewnątrzpochodny, jak się uważa, pełni jedynie funkcję wspomagającą.



Wykres 1. Schemat kaskady krzepnięcia – hemostaza wtórna (5). **Kolorem zielonym** oznaczono aktywujący wpływ trombiny. **Kolorem czerwonym** oznaczono punkty działania białek fibrynolitycznych w układzie hemostazy.

Tor zewnątrzpochodny jest aktywowany w momencie uszkodzenia ściany naczynia, które w miejscu uszkodzenia wyzwała ekspresję czynnika tkankowego (TF) na powierzchni śródbłónka naczynia. Czynn timer tkankowy jest, jak się obecnie uważa najważniejszym promotorem uruchomienia kaskady krzepnięcia krwi. Końcowym efektem uruchomionej kaskady krzepnięcia jest powstanie fibryny i aktywacja płytek krwi przez pobudzenie

receptorów zależnych od proteaz (6). TF łączy się w kompleks z czynnikiem VIIa (TF:FVIIa), który aktywuje czynnik X przy udziale jonów wapniowych i związków fosfolipidowych pochodzenia płytkowego. Kompleks TF:FVIIa w niewielkim stopniu aktywuje także tor wewnątrzpochodny krzepnięcia i czynnik IX. Aktywny czynnik Xa po połączeniu z aktywnym czynnikiem Va i fosfolipidami tworzy kompleks o aktywności enzymatycznej - protrombinazę (FVa:FXa), która katalizuje rozpad nieczynnej protrombiny do funkcjonalnie czynnej trombiny. Jest to **faza inicjacji krzepnięcia**. Ta wstępnie powstająca mała porcja trombiny jest niedostateczna dla proteolizy fibrynogenu w fibrynę (włóknik), ale staje się starterem dla uruchomienia zasadniczej fazy kaskady krzepnięcia. Trombina w mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego uaktywnia czynnik V, rozszczepia kompleks czynnika VIII i von Willebranda, aktywując czynnik VIIIa, oraz stymuluje powstanie czynnika XIa i XIIIa (stabilizator fibryny). W efekcie dochodzi do wytworzenia aktywnego czynnika XIa, który pobudza funkcję czynnika IX i powoduje wytwarzanie czynnika Xa, (katalizatorem tej reakcji jest aktywny czynnik VIIIa), a w dalszej konsekwencji trombinę. W ten sposób poprzez uaktywnienie drogi wewnątrzpochodnej, dochodzi do przyspieszenia powstawania trombiny i zwiększenia jej ilości. Umożliwia to ostateczne ukształtowanie skrzepu włóknikowego. **W warunkach fizjologicznych trombina scala wewnątrz- i zewnątrz- pochodną drogę krzepnięcia w jedną funkcjonalną i równoległą działającą całość poprzez stałą aktywację czynnika Xa w mechanizmie sprzężenia zwrotnego.** Występujący w wewnętrznej drodze krzepnięcia czynnik XII odgrywa jedynie rolę wspomagającą w aktywacji czynnika XI i nie ma rzeczywistego wpływu na powstanie skrzepu. Klinicznie niedobór czynnika XII – anomalia Hagemana, mimo że znajduje odzwierciedlenie w wydłużeniu czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), zazwyczaj nie powoduje objawów klinicznych. Czynnik XII odgrywa natomiast rolę w zapoczątkowaniu procesu fibrynolizy w układzie kalikreina/kinina, gdyż katalizuje reakcję rozpadu plazminogenu w plazminę.

W warunkach fizjologicznych proces krzepnięcia musi znaleźć przeciwwagę dla uzyskania równowagi w procesach hamowania i blokowania hemostazy, które zapobiegają wystąpieniu powikłań w postaci zakrzepicy lub uszkodzenia tkanek. Osiągnięcie takiej równowagi jest możliwe dzięki sprawnie działającym procesom fibrynolizy oraz prawidłowo funkcjonującym inhibitorom krzepnięcia. Do naturalnych inhibitorów krzepnięcia należą:

- antytrombina III (AT III)

- układ antykoagulacyjny białko C – białko S
- inhibitor zależnej od czynnika tkankowego zewnątrzpoходnej drogi krzepnięcia (TFPI).

AT III jest glikoproteiną produkowaną w wątrobie i śródbłonku naczyń. Jest zasadniczym czynnikiem, który odpowiada za 75% aktywności antykoagulacyjnej osocza. Jej aktywność wzrasta 1000 krotnie w obecności heparyny (w warunkach „in vivo” jest to siarczan heparanu śródbłonka naczyniowego). Działa blokując wspólną część obu torów kaskady krzepnięcia, poprzez unieczynnianie czynnika Xa i trombiny (czynnik IIa), a w mniejszym stopniu także innych aktywnych białek krzepnięcia jak czynnik XI, IX, VII.

Białko C to proteina witamino-K-zależna, również syntetyzowana w wątrobie. Dla prawidłowego funkcjonowania wymaga współdziałania z białkiem S, które pełni rolę kofaktora. Aktywacja białka C, indukowana przez obecność trombiny i trombomoduliny, powoduje dezaktywację czynników VIIIa i Va, hamując szlak wewnątrzpoходny kaskady krzepnięcia. Ponadto białko C podtrzymuje proces fibrynolizy poprzez inaktywację inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1) - głównego inhibitora fibrynolizy.

TFPI, jest białkiem produkowanym w wątrobie i śródbłonku, o charakterze lipoproteiny krążącej w osoczu w postaci kompleksów z frakcjami cholesterolu. Rola TFPI polega na trawieniu aktywnego czynnika Xa, oraz blokowaniu funkcji kompleksu TF/VIIa. W ten sposób dochodzi do zatrzymania fazy inicjacji oraz szlaku zewnątrzpoходnego kaskady krzepnięcia.

Efektom skutecznej hemostazy po aktywacji krzepnięcia w wyniku uszkodzenia naczynia krwionośnego jest rozpuszczenie skrzepliny i przywrócenie swobodnego przepływu krwi w naczyniu. Ten końcowy etap odbywa się w procesie fibrynolizy przy udziale plazminy. Białko to powstaje z nieaktywnego prekursora – plazminogenu, który jest rozszczepiany przez kompleks kalikreiny i czynnika XIIa oraz tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) z trombiną.

Wyżej opisane mechanizmy wskazują, że trombina z jednej strony, w sposób dynamiczny wielomiejscowo indukuje proces krzepnięcia prowadząc do wytworzenia skrzepu oraz równolegle wraz ze wzrostem jej ilości, zwrotnie aktywuje naturalne inhibitory krzepnięcia i stymuluje fibrynolizę.

II. Laboratoryjne wskaźniki układu krzepnięcia.

Ocena funkcjonowania układu hemostazy i fibrynolizy w praktyce klinicznej, jest możliwa dzięki testom laboratoryjnym. Wstępnymi badaniami przesiewowymi są morfologia krwi obwodowej z rozmazem oraz oznaczenie czasów krzepnięcia: czasu protrombinowego (PT) i czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT). W badaniu morfologii krwi obwodowej płytki krwi powinny być oceniane ilościowo i jakościowo poprzez określenie ich morfologii, często przekładającej się na ich nieprawidłową funkcję. Stwierdzenie małopłytkowości nakazuje poszukiwanie jej przyczyny. Dokładna ocena rozmazu krwi pozwala wykrywać niektóre wtórne przyczyny małopłytkowości np. hematologiczną chorobę nowotworową. Nieprawidłowa budowa płytek krwi, może wskazywać na wrodzoną, genetycznie uwarunkowaną ich dysfunkcję. Trombocyty małe są typowe dla zespołu Wiskotta-Aldricha (wynik mutacji w locus Xp11.23-p11.22), a płytki olbrzymie charakterystyczne dla zespołu Maya-Hegglin (wynik mutacji w locus 22q12-13).

Czas protrombinowy (PT) pozwala ocenić drogę wspólną i zewnątrzpochodną kaskady krzepnięcia. Obecnie w ocenie czasu protrombinowego częściej używa się standaryzowanego współczynnika międzynarodowy – INR, co pozwala porównywać uzyskane wartości niezależnie od zastosowanej metody i odczynników. Nieprawidłowe jego wartości mogą wskazywać na zaburzenia dotyczące czynników VII, X, V, II, fibrynogenu oraz czynnika tkankowego (TF). Czynniki II, VII, X oraz dodatkowo IX należą do grupy czynników witamino-K-zależnych, dlatego INR (PT) służy do kontrolowania efektywności leczenia przeciwkrzepliwego z zastosowaniem inhibitorów witaminy K, np. warfaryną. Dokonując oceny stanu krzepnięcia należy pamiętać, że w okresie pierwszego półrocza życia stężenia czynników witamino-K-zależnych oraz białek C i S są niższe i wynoszą około 50% wartości stwierdzanych w późniejszym okresie życia. Natomiast u dzieci powyżej 6 miesięcy życia czynniki osocze I, VIII i XIII oraz vWF osiągają wartości porównywalne z osobami dorosłymi. Uważa się, że fizjologiczne niedobory niektórych czynników krzepnięcia, chronią noworodki i niemowlęta przed powikłaniami zakrzepowymi, zmniejszając aktywność prozakrzepową osocza (3).

Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) służy ocenie wewnątrzpochodnej oraz częściowo drogi wspólnej kaskady krzepnięcia. Na podstawie stwierdzenia nieprawidłowych wyników tego badania można podejrzewać ilościowe niedobory czynników krzepnięcia tj. XII, XI, IX, VIII oraz ciężkie deficyty: X, V, II, I lub ewentualne występowanie ich inhibitorów. Dla właściwej oceny wyniku czasu APTT i PT i

zróźnicowania przyczyn istniejących zaburzeń duże znaczenie posiada **test korekcji**, który polega na połączeniu osocza badanego z osoczem wzorcowym. Ustąpienie w wyniku tej procedury, nieprawidłowości w oznaczanych czasach krzepnięcia (korekcja) wskazuje na występujące ilościowe niedobory czynników krzepnięcia. Natomiast brak korekcji świadczy o obecności inhibitorów czynników krzepnięcia.

Ocenę ilościową i jakościową fibrynogenu przeprowadza się poprzez jego oznaczenie ilościowe oraz badanie czasu trombinowego (TT). Badanie czasu TT polega na dodaniu trombiny do osocza badanego i pomiaru czasu niezbędnego do powstania skrzepu. Wydłużenie czasu może wskazywać na niedobór ilościowy fibrynogenu, lub obniżoną jego aktywność (dysfibrynogenię), jeżeli wartość stężenia tego białka pozostaje w zakresie normy (7).

III. Patofizjologia oddziaływania choroby nowotworowej na układ krzepnięcia.

Szczególne znaczenia nabiera ocena zaburzeń układu krzepnięcia w chorobie nowotworowej. Stan nadkrzepliwości w przebiegu nowotworów uwidacznia się często w występujących wyjściowych odchyleniach badań laboratoryjnych: trombocytozą, hiperfibrynogenią, zwiększeniem ilości produktów degradacji fibryny. Choroba nowotworowa powoduje wtórne zaburzenia ilościowe i jakościowe płytek krwi. Komórki nowotworowe stymulują produkcję płytek oraz pobudzają ich agregację. Terapia przeciwnowotworowa prowadzi do uszkodzenia endotelium naczyniowego. Czynniki te sprzyjają powstaniu mikroskrzepliny/mikrozatoru nowotworowego. Mechanizm ten jest uważany za decydujący w inwazyjności nowotworu i powstawania jego wtórnych ognisk (6). Nowotwór pobudza wydzielanie różnorodnych substancji prokoagulacyjnych: w tym głównie czynnika tkankowego (TF), nowotworowego prokoagulantu C (CP), który pobudza w sposób bezpośredni działanie czynnika X. Dodatkowym czynnikiem działającym pośrednio są odpowiedź zapalna i wydzielane przez nowotwór cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, TNF). Wśród wielokierunkowego działania cytokiny te pobudzają makrofagi i komórki endotelium, powodując wtórne zwiększenie w surowicy ilości TF – aktywatora drogi zewnątrzpochodnej procesu krzepnięcia (17, 18). Wspomniane cytokiny działają prozakrzepowo także, poprzez mechanizmy antyfibrynolityczne. Zmniejszają ekspresję trombomoduliny i blokują inhibitory krzepnięcia - białka C (duża rola alfa1-antytrypsyny) i białka S. Jednocześnie hamują syntezę i uwalnianie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). Cytokiny oddziałują także na

śródbłonek naczyniowy zwiększając ekspresję fosfolipidów błonowych dla czynników krzepnięcia oraz białek uczestniczących w adhezji komórek nowotworowych do ściany naczynia (17). Nowotwór lity wywierając ucisk na światło naczynia, spowalnia w nim przepływ, tworząc warunki sprzyjające rozwojowi zakrzepicy. W hematologicznych chorobach nowotworowych, zarówno ostrych jak i przewlekłych poprzez wzmożoną produkcję komórek nowotworowych, zwiększa się lepkość krwi i dochodzi do zwolnienia przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia – zespół leukostazy. Są to czynniki wyzwalające powikłania hemostatyczne – zatory i ogniska krwotoczne.

IV. Manifestacja kliniczna stanów prozakrzepowych.

1. Trombofilia

Zaburzenie równowagi hemostazy jest przyczyną wielu patologii z poważnymi konsekwencjami klinicznymi. Niedostateczne krzepnięcie, lub nadmierna fibrynoliza wyzwała powikłanie krwotoczne. Klasycznym przykładem takich zaburzeń równowagi jest hemofilia – wrodzony deficyt czynnika krzepnięcia VIII/IX lub choroba czarna noworodków ujawniająca się w przebiegu deficytu witaminy K i czynników II, VII, IX, X. Przeciwna sytuacja powstaje, gdy dochodzi do przewagi czynników prozakrzepowych. Stan taki może doprowadzić do występowania zakrzepów bądź zatorów, głównie w układzie żylnym, rzadziej tętnicznym. Takie zaburzenie nazywane jest **nadkrzepliwością**, a jego przyczyny tego mogą być różne. Stan nadkrzepliwości nazywany jest **trombofilia**. Jest to obecność stałej: wrodzonej lub nabytej cechy zwiększającej prawdopodobieństwo wystąpienia zakrzepicy. Dołączenie wtórnego czynnika ryzyka zakrzepicy (np. unieruchomienie) u osoby z trombofilia stwarza wysokie ryzyko wystąpienia choroby zakrzepowo-zatorowej. Częstość trombofilii w populacji europejskiej jest szacowana na około 8% ogółu populacji. Trombofilia jest rozpoznawana w 30-50% przypadkach zakrzepicy żyłnej u osób w wieku <50 rż.(7). Powtarzające się w wywiadzie rodzinnym (w pierwszej lub drugiej linii pokrewieństwa) takie zdarzenia jak.: zakrzepica żył głębokich (DVT), zatorowość płucna (ZP), zawał serca lub udar mózgowy u osób w wieku <40lat lub nawracające poronienia (>3) u kobiet>3, są ważnymi klinicznymi informacjami wskazującymi na występowanie trombofilii (8). Przyczyny trombofilii są zróżnicowane, zarówno wrodzone jak i nabyte. Najczęściej dochodzi do zwiększenia produkcji trombiny lub upośledzenia jej inaktywacji (7).

Do wrodzonych przyczyn trombofilii należą:

- mutacja genu czynnika V typu Leiden, 3-7% ogółu populacji

- mutacja genu protrombiny typu 20210G>A, 1-3% ogółu populacji
- niedobór inhibitorów krzepnięcia: AT III, białko C, białko S,
- homocystynuria oraz mutacja homozygotyczna typ 67TT genu reduktazy metylenoterahydrofolianu warunkująca wolny metabolizm homocysteiny.
- dysfibrynogemie, niedobór plazminogenu,
- zwiększona aktywność cz. VIII (>150%).

Zwiększone ryzyko nawracających incydentów zakrzepicy ujawnia się także u osób z niedoborami czynników antytrombolitycznych, jak niedobór AT III, białek C lub S (2,5krotnie większe ryzyko). U dzieci z nawrotami zakrzepicy potwierdzono wysoką częstość mutacji czynnika V (9). Obecność mutacji czynnika V typu Leiden oraz mutacja genu protrombiny (postacie heterozygotyczne) zwiększają ryzyko do 30%, natomiast warianty homozygotyczne tych defektów, zwiększają ryzyko nawrotu zakrzepicy aż pięciokrotnie (7).

Trombofilia nabyta może towarzyszyć niektórym chorobom ogólnoustrojowym jak:

- choroby układowe tkanki łącznej: zespół antyfosfolipidowy (obecność autoprzeciwciał przeciwko strukturom białkowo-fosfolipidowym), pierwotny lub w przebiegu toczenia rumieniowatego układowego lub reumatoidalnego zapalenia stawów
- choroby zapalne z wtórnym wystąpieniem hiperhomocysteinemii, najczęściej w przebiegu nieswoistych zapaleń jelita grubego, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego i Choroba Leśniowskiego-Crohna
- zwiększone stężenie czynników krzepnięcia IX, XI, VIII, zwykle w przebiegu chorób nowotworowych: chłoniaki, białaczki, rak sutka, rak jelita grubego oraz ich leczenia – chemioterapia z zastosowaniem cytostatyków, np. metotrexatu, fluorouracylu.

Poza nadkrzepliwością sprzyjające warunki do tworzenia skrzepliny w łożysku żylnym powstają w wyniku uszkodzenia śródbłonna oraz spowolnienie przepływu krwi (tzw. triada Virchowa 1856r). Jednoczesne występowanie co najmniej dwóch czynników prozakrzepowych, jest konieczne do uaktywnienia procesu zakrzepicy.

2. Żylna Choroba Zakrzepowo-Zatorowa (ŻCZZ) - kliniczna manifestacja stanu prozakrzepowego

Częstość występowania zakrzepicy żyłnej u dzieci nie została dotychczas dokładnie oszacowana. Prowadzone obserwacje jednoznacznie wskazują na duży wzrost częstości występowania zakrzepicy, szczególnie u dzieci hospitalizowanych. Zmiany zakrzepowo-zatorowe w wieku rozwojowym diagnozowane są głównie, jako występujące powikłania ciężkich schorzeń ogólnoustrojowych i ich intensywnego leczenia (10). Częściowy wpływ na

dane dotyczące częstości zakrzepicy ma coraz lepsza wykrywalność choroby. Według danych kanadyjskich częstość ta wynosi 0,07/10 000, holenderskich 0,14/10 000, a amerykańskich 0,49/10 000 osób w wieku 0-18 lat. Wyodrębniono dwie grupy ryzyka wyższej zapadalności zakrzepicy – dzieci poniżej 1 roku życia oraz młodzież powyżej 14 roku życia (11,12). W okresie noworodkowym i niemowlęcym główny wpływ na występowanie zakrzepicy mają uwarunkowania genetyczne, fizjologiczne procesy zachodzące w układzie hemostazy oraz intensyfikacja leczenia neonatologicznego. Wśród nastolatków wyższa zapadalność jest efektem sumowania się trombofilii oraz dołączających się czynników dodatkowych/środowiskowych (11,12,13,14).

Do czynników dodatkowych ryzyka wystąpienia zakrzepicy należą:

- długotrwałe unieruchomienie, otyłość
- przebyty zabieg operacyjny, uraz, złamanie
- zakażenie i sepsa
- choroba nowotworowa
- ciąża i połóg oraz leczenie hormonalne
- wcześniactwo, zamartwica
- wady i niewydolność serca
- zakażenia i przewlekłe stany zapalne – np. choroba Leśniowskiego-Crohna (7,14).

Klinicznymi objawami zakrzepicy żył głębokich mogą być:

- asymetrycznie obrzęknięte kończyny (uda, łydki), różnica obwodu kończyn >2cm
- zasinienie stóp i podudzi, ból przy chodzeniu i staniu
- ból, zaczerwienienie, wzmożone ucieplenie w miejscu obrzęku, napięcie skóry
- poszerzone naczynia krwionośne, przyspieszona czynność serca
- stan podgorączkowy lub gorączka
- ból w klatce piersiowej przy zatorze płucnym (7).

W diagnostyce choroby zakrzepowo-zatorowej u dorosłych określa się obecnie kliniczne prawdopodobieństwo zakrzepicy żył głębokich (DVT) lub zatorowości płucnej (ZP) przy wykorzystaniu skali Wellsa (tabela 1), ocenie wartości stężenia D-dimeru w osoczu oraz ocenie obrazu ultrasonograficznego łożyska naczyniowego z opcją dopplerowską i próbą uciskową na naczyniu (7). Potwierdzenie dużego prawdopodobieństwa wystąpienia zakrzepicy w skali Wellsa i po uzyskaniu pozytywnych wyników badań dodatkowych, jest wskazaniem do natychmiastowego wdrożenia właściwej terapii przeciwkrzepliwej.

Tabela 1: Skala Wellsa oceny prawdopodobieństwa klinicznego ZP i DVT.

Ocena prawdopodobieństwa klinicznego ZP (15)		Ocena prawdopodobieństwa klinicznego DVT (16)	
przebyta ŻŻ lub ZP	1,5pkt	Nowotwór złośliwy	1pkt
Niedawno przebyty zabieg chirurgiczny, unieruchomienie	1,5pkt	Niedowład, porażenie lub niedawne unieruchomienie kończyny dolnej w opatrunku gipsowym	1pkt
Nowotwór złośliwy	1pkt	Niedawne unieruchomienie w łóżku > 3 dni lub duży zabieg w ostatnich 4 tyg.	1pkt
Krwiotłucie	1pkt	Bolesność miejscowa w przebiegu żył głębokich kończyny dolnej	1pkt
Tachykardia >100/min	1pkt	Obrzęk całej kończyny dolnej	1pkt
Objawy ŻŻG	3pkt	Obwód goleni większy o >3cm w porównaniu z bezobjawową kończyną	1pkt
Inne rozpoznanie mniej prawdopodobne niż ZP	3pkt	Obrzęk ciastowaty	1pkt
		Widoczne żyły krążenia obocznego	1pkt
		Inne rozpoznanie równie lub bardziej prawdopodobne niż ŻŻG	-2 pkt

Interpretacja:

Prawdopodobieństwo kliniczne:

- małe 0-1pkt
- pośrednie 2-6 pkt
- duże ≥ 7 pkt

Interpretacja:

Prawdopodobieństwo kliniczne:

- małe ≤ 0 pkt
- pośrednie 1-2 pkt
- duże ≥ 3 pkt

V. Zakrzepica w chorobie nowotworowej.

1. Obraz kliniczny zakrzepicy.

Wśród pacjentów dorosłych z chorobą nowotworową, powikłania krwotoczne lub zakrzepowe, są drugą najczęstszą przyczyną śmiertelności po progresji i wznowie choroby (19). Największa częstość występowania zakrzepicy jest obserwowana w hematologicznych chorobach nowotworowych jak: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ostra białaczka szpikowa (AML) i w chłoniakach nieziarniczych (NHL) (20, 21). Istnieje duża wzajemna zależność pomiędzy nowotworem, a żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (ŻChZZ). Jako pierwszy zwrócił uwagę na ten fakt Trousseau w 1865r, który połączył występowanie wędrującego zakrzepowego zapalenia żył z rozpoznaniem nowotworu (22). Dotychczas opublikowane wyniki badań na temat powikłań zakrzepowych dotyczą głównie populacji ludzi dorosłych. Wiadomo, z badań u pacjentów dorosłych, że ŻChZZ może poprzedzać w czasie rozpoznanie onkologiczne o kilka miesięcy, a nawet lat. W okresie 6 miesięcy do 2 lat po epizodzie zakrzepicy u 10-20% pacjentów z idiopatyczną zakrzepicą żył głębokich

wykrywano chorobę nowotworową. Stąd ważne jest u ludzi dorosłych, w przypadkach rozpoznania zakrzepicy występującej bez czynników ryzyka, prowadzić przesiewową diagnostykę onkologiczną (23). Wykazano, że nawroty ŻChZZ są zdecydowanie częstsze w chorobie nowotworowej w porównaniu do osoby zdrowej, nawet podczas prowadzenia profilaktycznego leczenia przeciwzakrzepowego. Ryzyko wystąpienia ŻChZZ w chorobie nowotworowej w populacji ludzi dorosłych jest czterokrotnie większe, a chemioterapia podnosi je dodatkowo o 20% (24).

W badaniach dotyczących populacji dziecięcej stwierdzono, że zakrzepica w przebiegu choroby nowotworowej u dzieci, w 16% przebiega objawowo, zaś w 40% przypadków jest niema klinicznie. Przebiega najczęściej jako tzw. subkliniczna aktywacja układu krzepnięcia (25). Początkowo bezobjawowy stan chorego, może jednak w dalszym przebiegu choroby nowotworowej doprowadzić do ciężkich i zagrażających życiu epizodów zakrzepowych lub krwotocznych (21). Klasyczną postacią kliniczną zaburzeń krzepnięcia u dzieci z rozpoznaniem nowotworu jest rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (DIC). Uważa się, że aktywacja procesu krzepnięcia jest wynikiem stymulacji tego procesu przez czynniki związane bezpośrednio lub pośrednio z rozwojem nowotworu. Wraz z progresją choroby nowotworowej proces krzepnięcia z wytworzeniem mikroskręplin może nabierać dynamizmu zajmując coraz większą liczbę naczyń krwionośnych, co doprowadza do całkowitego „wyczerpania” czynników układu krzepnięcia – płytek krwi, czynników krzepnięcia, fibrynogenu. W dalszej konsekwencji dochodzi do załamania równowagi układu hemostazy i powstania zagrażających życiu krwawień. Większość objawowych przypadków zakrzepicy u dzieci z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), występuje w lokalizacjach krytycznych dla życia: centralny układ nerwowy, zatorowość płucna (ZP), skręplina w prawym przedsionku. Średni współczynnik śmiertelności w przebiegu zakrzepicy u dzieci z ALL wynosi 15% (21,26,27). Wysoka śmiertelność z powodu zmian zakrzepowo-zatorowych jest często maskowana poprzez powikłania krwotoczne lub infekcyjne (17). Należy podkreślić, że w przypadkach choroby nowotworowej ryzyko powstania zakrzepicy zwiększa się także ze względu na możliwość wystąpienia szeregu pierwotnych i wtórnych czynników predysponujących, jak i wzajemnego ich współwystępowania co dodatkowo eskaluje istniejące ryzyko żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ). U populacji dziecięcej choroby nowotworowe, mimo że są rozpoznawane rzadko, odpowiadają za wystąpienie około 40% przypadków zakrzepicy w tym wieku. Ryzyko zakrzepicy u dzieci z rozpoznaniem nowotworowym określa się jako 600 razy większe niż ryzyko u dzieci zdrowych (26).

2. Terapia nowotworowa.

Dodatkowym ważnym czynnikiem ściśle związanym z nowotworem, który wywołuje zaburzenia układu krzepnięcia – krwotoczne i zakrzepowe, jest terapia z zastosowaniem leków cytostatycznych. Przykładem szeroko opisywanym w piśmiennictwie może być stosowana w leczeniu ALL: L-asparaginaza (L-aspa). Lek ten blokuje syntezę asparaginy, a tym samym zmniejsza dostępność aminokwasu dla komórek białaczkowych powodując ich apoptozę. Lek ten wśród ubocznych niekorzystnych działań wywiera wpływ hamujący na syntezę wielu białek, m.in. także białek układu krzepnięcia. L-aspa powoduje obniżenie stężenia antytrombiny w osoczu poniżej 50% oraz zmianę konformalną cząsteczki, co wpływa na deficyt ilościowy i jakościowy białka AT III. Jest to istotny czynnik ryzyka wystąpienia powikłań zakrzepowych. Stąd w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowym, u chorych leczonych L-aspa, stosuje się suplementację AT III (28). L-aspa wywołuje również obniżenie poziomu innych białek istotnych dla hemostazy tj. alfa1-antytrypsyny, białka C i S, . Te działania uboczne stymulują proces krzepnięcia głównie przez obniżenie ilości naturalnych antykoagulantów (27, 30). L-aspa oddziałuje także na zmniejszenie stężenia fibronektyny w osoczu, powodując wzrost ilości monomerów fibryny krążących w łożysku, a także zwiększa produkcję trombiny. Inne cytostatyki jak np. busulfan, aktynomycyna, arabinozyd cytozyny działają uszkadzająco na śródbłonek drobnych naczyń i zatok wątrobowych. Wyzwala to proces tworzenia mikrozakrzepów. Mikrozakrzepy powstają na drodze przewagi mechanizmów zakrzepowych nad fibrynolitycznymi w skutek uwalniania cytokin z uszkodzonego śródbłonka: IL-1, TNF- α oraz gromadzenia czynnika von Willebranda stymulującego agregację płytek (30). Klinikcznym obrazem tych zaburzeń jest rozpoznawana u części chorych leczonych wymienionymi cytostatykami choroba wenookluzyjna wątroby (VOD). Opisane zostały również działania prozakrzepowe innych leków cytostatycznych jak dakarbazyny, która może być przyczyną zakrzepicy żył wątrobowych (z. Budda-Charii), bleomycyny i cisplatyny, po których wystąpić mogą mikroangiopatie zakrzepowe: zespół hemolityczno-mocznicowy lub zakrzepowa płamicę małopłytkową (31). Należy podkreślić, że zwiększenie potencjału zakrzepowego następuje także poprzez stosowanie w terapii onkologicznej leków hormonalnych – glikokortykosteroidów lub estrogenów.

3. Rola centralnych cewników naczyniowych.

Ważnym dodatkowym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby zakrzepowo-zatorowej u chorych onkologicznych jest stosowanie centralnych cewników naczyniowych.

Leczenie przeciwnowotworowe u dzieci prowadzone jest z zastosowaniem permanentnych centralnych cewników naczyniowych (CVL). Jest to najsilniejszy i najczęstszy dodatkowy czynnik prozakrzepowy u dzieci. Cewniki centralne są obecnie, przy znacznej intensyfikacji leczenia onkologicznego elementem niezbędnym w prowadzeniu tego leczenia u dzieci. Cewnik centralny pozwala na dożylną podaż leków cytostatycznych i innych leków uzupełniających niezbędnych w kompleksowym leczeniu oraz wielokrotny pobór krwi do analizy laboratoryjnej. Obecność CVL wiąże się z występowaniem powikłań, do których należą najczęściej infekcja i zakrzepica. Częstość tych powikłań u dzieci z nowotworem oszacowano na 40-46%, zaś samej zakrzepicy na 20-30% (24, 32, 33, 34). Czynnikiem sprzyjającym powstawaniu powikłań zakrzepowych w okolicy cewnika centralnego jest infekcja odcewnikowa u chorych z nowotworem. Zakrzepica odcewnikowa zwiększa ryzyko powstawania skrzeplin również w innych lokalizacjach, a nieprawidłowe funkcjonowanie dożylnego cewnika centralnego, poprzez konieczność jego wymiany oraz opóźnienia w leczeniu onkologicznym, ma negatywny wpływ na przeżycie dzieci z chorobą nowotworową (33, 34). Zdarza się że zakrzepica odcewnikowa pozostaje długo nierozpoznawana, gdyż nie dysponujemy pewnymi metodami diagnostycznym służącymi postawieniu takiej diagnozy. Będące w użyciu klinicznym ultrasonografia uciskowa z funkcją Doppler, obustronna wenografia, czy angiografia w badaniu rezonansem magnetycznym nie posiadają 100% czułości i swoistości diagnostycznej dla zakrzepicy odcewnikowej (55). Ocenę utrudnia implantowany w świetle naczynia cewnik, który zmniejsza średnicę żyły i zaburza laminarny w niej przepływ. Istnieją różne warianty powstania skrzepliny odcewnikowej. Najczęściej skrzeplina występuje wzdłuż przebiegu cewnika, ewentualnie lokalizuje się na jego wolnym końcu w świetle żyły głównej górnej. Skrzeplina może również być położona przyściennie w naczyniu, przez które przebiega cewnik. Najrzadziej skrzeplina występuje w tunelu wewnętrznym kateteru, powodując najczęściej, w przeciwieństwie do pozostałych lokalizacji skrzepliny, jego trwałą dysfunkcję. Dysfunkcja cewnika może być częściowa, kiedy wlew leku przez cewnik jest możliwy lub pełna (brak możliwości podania leku, lub pobrania krwi), a jej częstość u dzieci z nowotworem jest szacowane na około 30% chorych (8, 33, 34, 35). Czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia niedrożności cewnika są: pozytywny wywiad rodzinny w kierunku występowania incydentów zakrzepicy oraz występowanie wcześniejszych incydentów zakrzepicy u samego chorego. Znaczenia nabiera typ cewnika centralnego, albowiem w związku z dłuższym czasem implantacji, dysfunkcja cewnika częściej występuje w przypadku kateteru typu Hickman'a lub portu naczyniowego, niż w odniesieniu do cewników centralnych założonych z dostępu obwodowego. Zaobserwowano

znaczenie techniki implantacji oraz głębokości na jaką wprowadzono końcówkę cewnika w występowaniu jego dysfunkcji. Implantacja w gabinecie angiografii naczyniowej oraz lokalizacja końcówki cewnika w żyłę główną górną, wiąże się z wyższą częstością dysfunkcji cewnika, w przeciwieństwie do chirurgicznej implantacji kateteru w oparciu o metodę wenesekcji i wprowadzenie końcówki na głębokość wlotu do prawego przedsionka (19). Pacjenci z nieprawidłowo działającym kateterem mają znacząco wyższe ryzyko (3,7-14,7 razy) rozwoju objawowej zakrzepicy odcewnikowej (8, 35, 36, 37), szczególnie przy lokalizacji masy patologicznej w śródpiersiu, lub innej nieonkologicznej choroby płuc (18). Dzieci po przebyciu niedrożności CVL w trakcie leczenia onkologicznego mają wyższe ryzyko wystąpienia zespołu pozakrzepowego, także po zakończeniu leczenia onkologicznego i usunięciu cewnika (37, 38). U dzieci z ALL, leczonych z wykorzystaniem CVL, stwierdzono wyższe ryzyko zależnej od kateteru zakrzepicy żył głębokich przy implantacji cewnika po lewej stronie ciała (38) i przez żyłę podobojczykową oraz w okresach stosowania chemioterapii z wykorzystaniem asparaginazy i glikokortykosteroidów (39, 40, 41). Ryzyko zakrzepicy jest również wyższe jeżeli cewnik centralny był implantowany przez żyłę obwodową, co wynika z większych zaburzeń w przepływie krwi wywołanych cewnikiem (długi cewnik centralny przebiegający w wąskim naczyniu obwodowym) oraz często ciężkim stanem chorego dyskwalifikującym z założenia cewników typu Hickman'a lub portu naczyniowego). Symptomy zakrzepicy - ból, obrzęk, sinica, poszerzenie siatki naczyniowej na klatce piersiowej – zależą od lokalizacji, wielkości oraz dynamizmu powstania skrzepliny. Również infekcja odcewnikowa ma udokumentowany wpływ na rozwój CVL - zakrzepicy u dzieci z aktywnym nowotworem. Należy podkreślić, że jednocześnie wystąpienia zakażenia u dziecka z dysfunkcją cewnika centralnego podwyższa ryzyko rozwoju zakrzepicy (8, 41). Kolejnymi czynnikami ryzyka związanymi z leczeniem choroby nowotworowej i powikłaniami są zabiegi operacyjne, unieruchomienie lub odwodnienie, które poprzez aktywację czynników prozapalnych, przymusową pozycję, zagęszczenie krwi zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju zakrzepicy.

W podsumowaniu należy podkreślić, że **pacjent z rozpoznaniem choroby nowotworowej ma bardzo wysokie ryzyko wystąpienia zakrzepicy, z powodu sumowania się wielu czynników ryzyka związanych z chorobą i jej bardzo intensywnym leczeniem** (18, 19).

VI. Terapia powikłań zakrzepowych choroby nowotworowej.

Współcześnie leczenie zakrzepicy opiera się na stosowaniu wybiórczo działających leków przeciwkrzepliwych. Duży postęp farmakoterapii tego schorzenia widoczny jest we wdrażaniu nowych grup leków w terapii osób dorosłych. Natomiast u dzieci zalecenia terapeutyczne są najczęściej ekstrapolowane z badań i obserwacji prowadzonych u dorosłych. Terapia zakrzepicy opiera się na modelu dwufazowym: leczeniu choroby w fazie pełnoobjawowej oraz farmakoterapii profilaktycznej. Profilaktyka przeciwdziała wystąpieniu incydentu zakrzepicy w grupach chorych o bardzo wysokim ryzyku (pierwotna) lub jej nawrotowi (wtórna). Model ten opiera się na potrzebie ciągłej naukowej analizy zasadności leczenia wyprzedzającego, co powoduje że wytyczne, szczególnie w odniesieniu do profilaktyki zmieniają się. Mała przejrzystość zaleceń widoczna jest szczególnie w populacji dziecięcej. Podstawowymi lekami stosowanymi w zakrzepicy obecnie u dzieci są: heparyna niefrakcjonowana (UFH) oraz związki heparyny drobnocząsteczkowej (LMWH), a także antagoniści witaminy K (VKA), leki fibrynolityczne: urokinaza, altepaza (t-PA). Zastosowanie VKA metabolizowanych w wątrobie, wiąże się z możliwością wystąpienia licznych interakcji lekowych zwiększających lub zmniejszających działanie leku, co może generować wystąpienie dodatkowych powikłań. Stwierdzenie zakrzepicy jest bezwzględnym wskazaniem do wdrożenia terapii heparyną z równoczesnym podawaniem VKA przez okres 4-5 dni. Zgodnie z przyjętym schematem postępowania, konieczne jest uzyskanie terapeutycznego efektu leku VKA, który weryfikowany jest poprzez kontrolne badania INR. Docelowo dąży się do osiągnięcia i utrzymywania wartości INR - 2,5 (zakres 2,0 – 3,0). Po osiągnięciu tych wartości INR leczenie heparyną powinno być zakończone. Od tego ogólnego schematu postępowania istnieje szereg odstępstw, zależnych od stanu ogólnego chorego, lokalizacji i rozległości zakrzepicy, współwystępujących powikłań krwotocznych i innych towarzyszących chorób przewlekłych. Tylko w ściśle określonych stanach zakrzepowych u dzieci istnieją wskazania do zastosowania leków fibrynolitycznych. Leki przeciwkrzepliwe nowej generacji: bezpośredni inhibitor czynnika Xa (rywaroksaban, apiksaban) lub bezpośredni inhibitor trombiny (eteksylan dabigatranu), nie uzyskały dotychczas rejestracji do klinicznego zastosowania u dzieci. Ważnym aspektem terapii zakrzepicy u dzieci jest odmienny metabolizm leków. Im młodsze dziecko tym leki są szybciej metabolizowane i krótszy jest ich okres półtrwania. Dlatego w terapii LMWH u dzieci <2 miesiąca życia lub wagą poniżej 5 kilogramów leki podaje się w ilości 150% dawki dorosłego. Ponadto

dostosowuje się dawkę leków do poziomu aktywności anty-Xa (zakres docelowy wynosi 0,6-1,0). Początkowe dawki VKA są dobierane do wieku i wagi pacjenta, a następnie dawki dostosowuje się do wartości INR (42). W obowiązujących zaleceniach u dzieci z chorobą nowotworową nie zaleca się pierwotnego profilaktycznego leczenia przeciwkoagulacyjnego. Zastosowanie cewnika centralnego również nie stanowi wskazania do rutynowej profilaktyki, za wyjątkiem długotrwałego żywienia pozajelitowego, w którym zaleca się terapię VKA (INR 2,0-3,0) – siła zaleceń 2C (43). Zalecenia dotyczące czasu trwania leczenia zakrzepicy występującej u dziecka w przebiegu choroby nowotworowej są zgodne z ogólnym wytycznymi, tj. LMWH, przez minimum 3 miesiące, lub dłużej, do czasu ustąpienia czynnika wywołującego. W przypadku niedrożności cewnika, zaleca się docewnikowe zastosowanie t-PA/urokinazy na okres minimum 30 minut z możliwością powtórzenia leczenia (42). W profilaktyce niedrożności cewnika centralnego obecnie dostępne są leki o jednoczesnym działaniu przeciwinfekcyjnym i przeciwkrzepliwym do profilaktycznego wypełniania tunelu cewnika centralnego – TauroLock®. Lek zawiera taurolidynę o działaniu p/infekcyjnym i 4% roztwór cytrynianu o działaniu antykoagulacyjnym.

VII. Udział układu krzepnięcia w stymulacji rozwoju choroby nowotworowej.

Układ krzepnięcia odgrywa kluczową rolę w rozwoju choroby nowotworowej. Proces wzrostu guza pierwotnego i tworzenia odległych przerzutów nowotworu jest ściśle związany z pobudzeniem kaskady krzepnięcia (44, 45, 46). U około 50% pacjentów z nowotworem i u około 90% pacjentów ze zmianami przerzutowymi występują nieprawidłowości koagulologiczne, które są następstwem wzrostu poziomu różnorodnych czynników krzepnięcia (47). Opublikowane badania zwracają uwagę na aktywny udział w rozwoju nowotworu czynnika tkankowego (TF), nazywanego również: czynnikiem III lub tromboplastyną tkankową. Jest on podstawowym inicjatorem krzepnięcia krwi zlokalizowanym w ścianie naczynia krwionośnego. Badania roli TF w okresie embriogenezy wykazały, że obniżenie lub brak ekspresji czynnika w trakcie embriogenezy powoduje zaburzenia budowy naczyń, krwawienia i śmierć zarodka (6). TF wykazuje narządowe zróżnicowanie intensywności ekspresji. W narządach takich jak mózg, serce, łożysko, płuca jego ekspresja jest bardzo duża i stanowi dodatkowe zabezpieczenie przed krwawieniami i ich skutkami w tych organach. Tam gdzie ekspresja TF jest mniejsza, np. mięśniach i stawach, stwierdza się zwiększenie ekspresji innych czynników kaskady krzepnięcia, głównie drogi

wewnątrzpochodnej (FVIIIa i FIXa). Z tej fizjologicznej zmienności rozmieszczenia czynników krzepnięcia wynika duża predyspozycja chorych na hemofilię do występowania samoistnych wylewów głównie do stawów i mięśni (6). Lokalizację narządową czynnika TF uzupełnia osoczowa – rozpuszczalna postać TF, która w głównej mierze w stanach trombofilii przyczynia się do powstawania powikłań zakrzepowo-zatorowych. W stanach zdrowia stężenie TF w osoczu wynosi około 149 – 172pg/ml (6). Badania dowodzą, że w niektórych jednostkach chorobowych jak: zawał serca, udar mózgu, zakrzepica naczyń, posocznica oraz cukrzyca stężenie to stymulowane cytokinami prozapalnymi, ulega wzrostowi (6). Wysokie stężenie TF w osoczu zaobserwowano w niektórych chorobach nowotworowych u dorosłych (22, 48, 49, 50). Uważa się że sam nowotwór może produkować i uwalniać TF w następstwie kancerogennych mutacji genów lub oddziaływania czynników produkowanych przez nowotwór na podścielisko oraz w efekcie niedotlenienia tkanki nowotworowej (46). TF wraz z czynnikiem VIIa poprzez wpływ na proteazy czynników krzepnięcia oraz receptory zależne od tych proteaz (PAR1-4) obecne w komórkach endotelium, nie tylko bierze udział w procesach prozakrzepowych, ale również wpływa na wewnątrzkomórkowe procesy takie jak: system transdukcji sygnału, transkrypcja genów, powstawanie białek (46, 48, 49, 50). Odgrywa więc istotną niehemostatyczną rolę w pobudzaniu procesów biologicznych nowotworu jak: migracja komórek, proliferacja, apoptoza, uruchomienie i pobudzenie reakcji zapalnej. Ingerencja TF w wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne wpływa na wzrost guza i tworzenie przerzutów (4, 6, 46, 48, 50). Czynnikiem ten uczestniczy także w mechanizmach kontroli adhezji i przemieszczania się komórek, przenikania komórek do i z układu krwionośnego, współdziałania z układem immunologicznym. Ponadto białko TF, jako jeden z receptorów przezłonowych, po połączeniu z FVIIa zmienia odpowiedź komórkową wpływając na transkrypcję genów i w konsekwencji reguluje proliferację komórek (46, 48, 50). Ponadto kompleks TF-FVIIa prowadzi do wewnątrzkomórkowej aktywacji kinaz antyapoptotycznych, których uruchomienie blokuje śmierć komórki i sprzyja onkogenezie. Potwierdzono został wpływ TF na powstawanie naczyń zarówno w okresie embriogenezy jak i w chorobie nowotworowej (4, 6, 48, 50). Pośrednio ten mechanizm ułatwia tworzenie przerzutów, gdyż przerzutowanie w dużej mierze wynika ze zdolności do tworzenia nowych naczyń – angiogenezy. W raku niedrobnokomórkowym płuca oraz raku prostaty wykazano związek pomiędzy ekspresją TF i gęstością naczyń mikrokrażenia (MVD) oraz ekspresją naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), najsilniejszego czynnika wzrostu naczyń krwionośnych (46, 50). W transformowanych komórkach nowotworowych z nadekspresją TF zaobserwowano gwałtowny wzrost naczyń i lepsze unaczynienie. W

przypadku zastosowania antysensownych oligonukleotydów anty-TF – rozwój naczyń był istotnie wolniejszy (50).

Dotychczas nie opublikowano badań oceniających stężenie i ekspresję TF w nowotworach u dzieci. Nie podjęto również kompleksowej oceny związku pomiędzy TF, a onkogenezą i powstawaniem przerzutów. Jak dotąd stwierdzono, że w nowotworach u dorosłych poziom TF jest podwyższony, a w stadium rozsianym z obecnymi przerzutami ekspresja TF jest do 1000 razy większa niż w guzach zlokalizowanych. W raku gruczołu sutkowego, raku jelita grubego i czerniaku stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy stężeniem TF, a powstawaniem przerzutów (50). Badania pokazują, że ekspresja TF w tkance nowotworowej, koreluje ze stopniem złośliwości ludzkich glejaków. Wraz z rozwojem złośliwego glejaka dochodzi do powstawania ognisk nekrotycznych, otoczonych pseudopalisadowymi komórkami. Komórki stymulowane stanem hipoksji wydzielają czynniki proangiogenne, a także TF, który również pobudza rozwój nowych naczyń i stymuluje progresję glejaka (50, 51). W raku jelita grubego, niedrobnokomórkowym raku płuc, raku sutka, raku wątroby oraz raku prostaty udowodniono istotną zależność pomiędzy stężeniem TF, a nasileniem angiogenezy – szybszy wzrost naczyń krwionośnych i poprawę ukrwienia guza (22, 49, 50, 52). W nowotworach tych wysoki poziom TF był niezależnym czynnikiem prognostycznym krótszego przeżycia.

Podsumowując: TF pełni istotną rolę w procesach kancerogenezy i tworzenia przerzutów w chorobie nowotworowej, poprzez:

- pobudzenie angiogenezy w miejscach rozwijającego się guza i tworzących się przerzutów,
- produkcję białek, które współtworzą środowisko sprzyjające do powstania przerzutu,
- hamowanie apoptozy,
- oddziaływanie poprzez molekuly adhezyjne na śródbłonek naczyń (46, 47, 49).

Istnieją dowody, że u dorosłych terapia przeciwkrzepliwa heparyną przedłuża życie chorych zmniejszając ryzyko powikłań związanych z ŻChZZ w przebiegu nowotworu. Korekcja zaburzeń w hemostazie, indukowanych nowotworem i regulacja szlaków sygnałowych komórek zależnych od receptora TF:FVIIa, może blokować procesy wewnątrzkomórkowe prowadzące do progresji nowotworowej. Stąd ważna jest ocena wpływu leków o działaniu modulującym układ krzepnięcia, także pod kątem działania przeciwnowotworowego. Wyniki badań w populacji ludzi dorosłych wskazują, że przyjmowanie doustnych antykoagulantów zmniejsza ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową o 20%. (53). Wykazano, że stosowanie heparyny ma liczne antynowotworowe

działanie jak: blokowanie powstania trombiny i fibryny, modulacja systemu immunologicznego, blokowanie adhezji komórek nowotworowych, hamowanie neoangiogenezy oraz proliferacji komórek endotelium, stymulowanie apoptozy (54).

Z dotychczasowych badań, jednoznacznie wynika wielopłaszczyznowy wzajemny związek układu krzepnięcia i choroby nowotworowej. W onkologii dorosłych udowodniono wpływ czynnika tkankowego na rozwój i przebieg nowotworów. Nowotwory typu dziecięcego różnią się budową histopatologiczną, przebiegiem klinicznym choroby, charakteryzującym się dużym dynamizmem, wysokim zaawansowaniem w momencie diagnozy oraz wrażliwością na leczenie chemiczne i promieniowanie jonizujące. W niniejszej pracy podjęto próbę określenia stanu układu krzepnięcia w nowotworach dziecięcych w odniesieniu do obrazu klinicznego oraz związek hemostazy ze stopniem zaawansowania i biologią guza Ponadto analizie poddano obecność w tkankach nowotworowych i stężenie w surowicy czynnika TF w wybranych nowotworach dziecięcych, celem określenia ewentualnego udziału tego czynnika w rozwoju tych chorób u dzieci. Wyniki badań układu hemostazy w nowotworach dziecięcych mogą mieć w przyszłości również znaczenie terapeutyczne w nowotworach litych wieku rozwojowego.

Cel pracy:

Celem niniejszej pracy badawczej była ocena stanu układu krzepnięcia w zależności od parametrów klinicznych oraz typu histologicznego wybranych nowotworów wieku rozwojowego. W tym celu zaplanowano następujące zadania badawcze:

- 1. Ocenę parametrów układu krzepnięcia w surowicy krwi u dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej z uwzględnieniem wybranych parametrów klinicznych choroby.**
- 2. Porównanie parametrów hemostazy w surowicy krwi przed i po terapii przeciwnowotworowej.**
- 3. Ocenę ekspresji wybranych wskaźników hemostazy w tkankach nowotworowych badanej populacji chorych.**

MATERIAŁY I METODY

I. Charakterystyka grupy badanej

Kohortowymi badaniami prospektywnymi objęto 86 pacjentów Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) leczonych w latach 2008-2014r z powodu rozpoznania choroby nowotworowej. Na prowadzenie pacy badawczej zgodę wyraziła Niezależna Komisja Bioetyczna Do Spraw Badań Naukowych przy GUMed uchwałą Nr 197/2008. Do badania zakwalifikowano chorych posługując się następującymi kryteriami włączenia:

- wiek zachorowania 0-18 lat,
- stwierdzenie na podstawie wstępnej diagnostyki onkologicznej guza złośliwego o radiologicznych cechach złośliwości lub chłoniaka ziarniczego, potwierdzone badaniem histopatologicznym
- prawidłowe parametry biochemiczne oceniające funkcję wątroby.

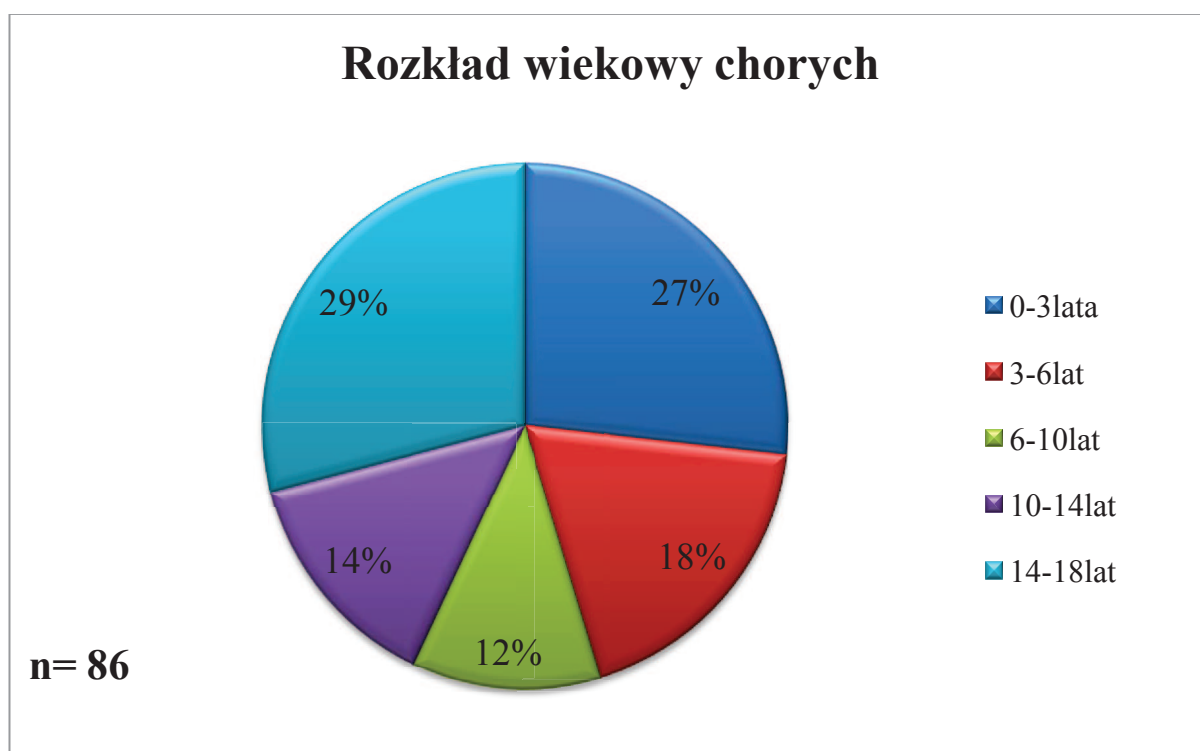
Pacjenci z postawioną diagnozą onkologiczną leczeni byli standardowymi protokołami terapeutycznymi obowiązującymi dla określonych rozpoznań histopatologicznych.

W grupie badanej było: 37 dziewcząt (43%) oraz 49 chłopców (57%).



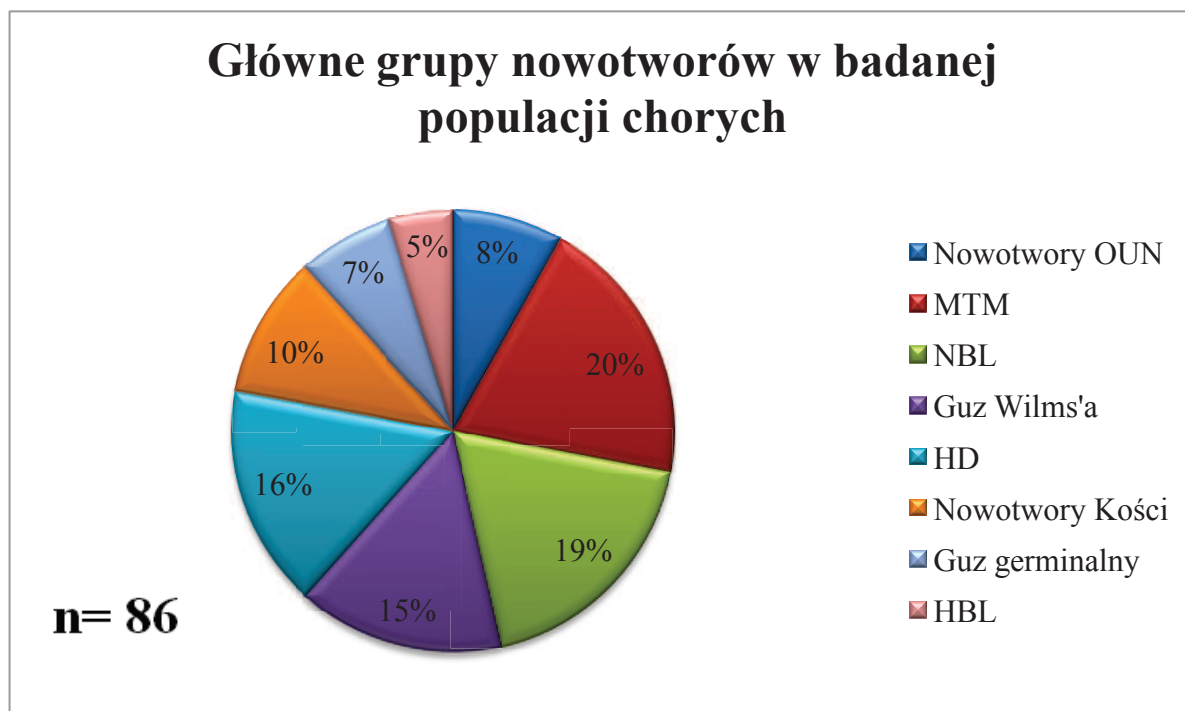
Wykres 2. Rozkład płci grupy badanej.

Wiek zachorowania pacjentów kształtował się w zakresie od 5 doby życia do 18 lat. W grupie pacjentów najmłodszych (0-3 lata) znajdowało się 23 dzieci (27%), zaś w wieku 3-6 lat – 16 pacjentów (18%). Najmniej liczną grupę stanowiły dzieci w wieku 6-10 lat – 10 chorych (12%) oraz chorzy w wieku zachorowania 10-14 lat – 12 (14%). Młodzież (14-18 lat) była reprezentowana najliczniej – 25 osób (29%). W najmłodszych grupach wiekowych dominowały rozpoznania nowotworów o etiologii związanej z przetrwałą tkanką płodową: zwojak zarodkowy współczulny (neuroblastoma) oraz nerczak płodowy (nefroblastoma). W grupie nastolatków przeważały: Chłoniak ziarniczny oraz mięsaki tkanek miękkich i guzy kości. Taka rekrutacja pacjentów do badania odpowiada epidemiologicznym danym o zapadalności nowotworów dziecięcych w Polsce.



Wykres 3. Rozkład wiekowy chorych w badanej grupie.

Do grupy badanej włączono pacjentów z rozpoznaniem: nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) - 7, mięsaki tkanek miękkich (MTM) - 17, zwojak zarodkowy współczulny (NBL) - 16, guz Wilms'a - 13, nowotwory kości - 9, nowotwory germinalne (GCT) - 6, wątrobiak zarodkowy (HBL) – 4 oraz chłoniak Hodgkina (HD) – 14 chorych.



Wykres 4. Główne grupy nowotworów w badanej grupie chorych.

Wśród chorych z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego (OUN), u czterech rozpoznano glejaka wielopostaciowego oraz u trzech pacjentów - rdzeniaka zarodkowego. Grupę chorych z guzami typu zwojaka zarodkowego współczulnego (NBL) utworzyły: nerwiak zarodkowy – 10 chorych i nerwiak zarodkowy zwojowy – 6 chorych. Grupę chorych z mięsakami tkanek miękkich (MTM) utworzyło 17 dzieci z rozpoznaniem: mięsak prążkowanokomórkowy typ płodowy (RMSE) – 7, mięsak maziówkowy – 4, mięsak prążkowanokomórkowy typ pęcherzykowy (RMSA) – 3, pozakostna postać guza Ewing'a – 2, nerwiakomięsak – 1 chory. Dane dotyczące budowy histopatologicznej w grupie OUN, NBL i mięsaków tkanek miękkich, zawarto w tabeli nr 2.

Tabela 2. Rozpoznania histopatologiczne w grupie nowotworów OUN, NBL i Mięsaków.

Diagnoza	Rozpoznanie histopatologiczne	Liczba chorych
Nowotwory OUN	Glejak wielopostaciowy	4
	Rdzeniak zarodkowy	3
Neuroblastoma	Nerwiak płodowy	10
	Nerwiak płodowy zwojowy	6
Mięsaki tkanek miękkich	Mięsak prążkowany komórkowy typ płodowy	7
	Mięsak maziówkowy	4
	Mięsak prążkowany komórkowy typ pęcherzykowy	3
	Guz Ewing’a postać pozakostna	2
	Nerwiakomięsak	1

(OUN – ośrodkowy układ nerwowy)

W podgrupie guzów kości rozpoznano siedem przypadków guza Ewing’a oraz dwa przypadki mięsaka kościopochodnego (osteosarcoma). Nowotwory germinalne rozpoznano u sześciu chorych. Były to: kosmówczak, rozrodczak, guz pęcherzyka żółtkowego oraz trzy złośliwe guzy germinalne o mieszanej budowie histopatologicznej. W grupie guzów Wilms’a rozpoznanych u 13 chorych, podtyp nabłonkowo-mezenchymalny występował u 10 chorych, a podtyp blastemiczny u 3 chorych. W odniesieniu do pozostałych typów nowotworów, w 4 przypadkach rozpoznano hepatoblastoma typu płodowego, a u 14 chorych chłoniaka Hodgkina, który prezentował budowę typu stwardnienia guzkowego. Zbiorcze dane dotyczące liczebności grup chorych pod względem rozpoznania zawarto w tabeli nr 3.

Tabela 3. Rozpoznania nowotworowe w badanej grupie.

Rozpoznanie	MTM	NBL	HD	Wilms	Kości	OUN	GCT	HBL
Liczba chorych	17	16	14	13	9	7	6	4
Rozkład procentowy %	20	19	16	15	10	8	7	5

(MTM – mięsaki tkanek miękkich, NBL – zwojak współczulny zarodkowy, HD – Chłoniak Hodgkina, Wilms – guz Wilms’a, Kości – nowotwory kości, GCT – nowotwory germinalne, HBL – wątrobiak zarodkowy)

W oparciu o podobieństwo etiopatogenetyczne części nowotworów wieku dziecięcego i wspólne pochodzenie z przetrwałej tkanki płodowej oraz wspólne histopatologiczne pochodzenie mięsaków, a także ze względu na lokalizację rozpoznania nowotworowe, zostały połączone w następujące grupy:

Podgrupa 1. Chorzy z złośliwymi nowotworami pochodzenia zarodkowego, nie mięsakami: zwojak zarodkowy współczulny, nerczak zarodkowy (guz Wilms'a), wątrobiak zarodkowy oraz nowotwory germinalne - 39 pacjentów (46%),

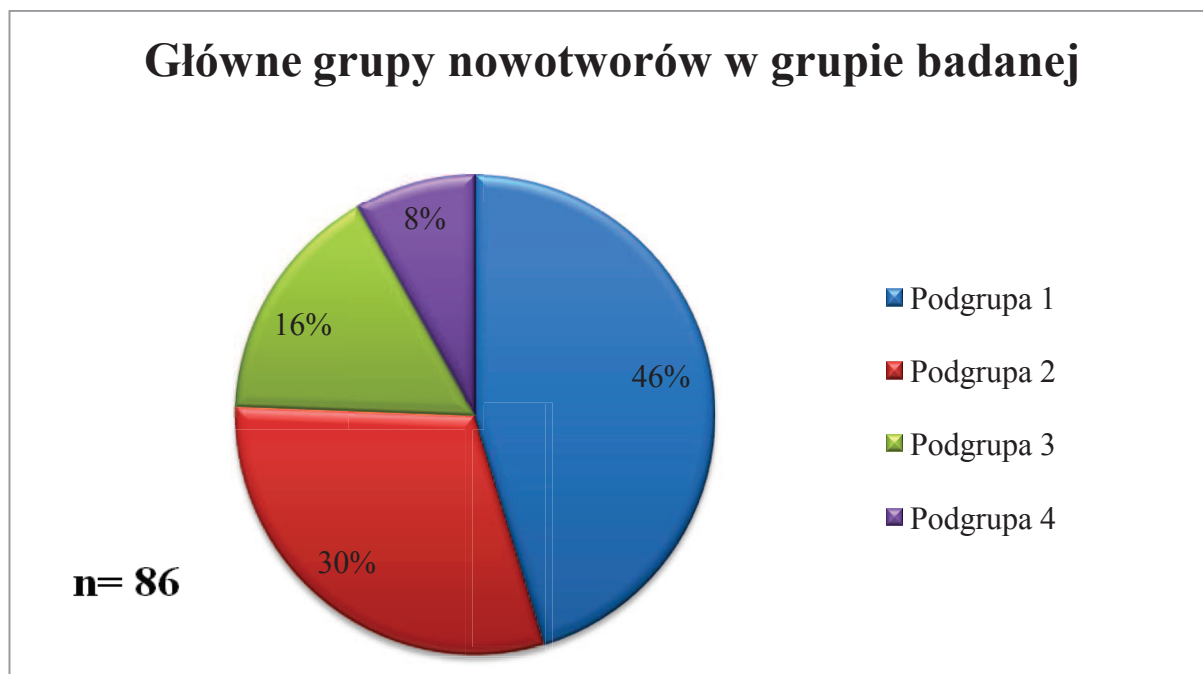
Podgrupa 2. Chorzy z guzami tkanek miękkich i kości – 26 chorych (30%),

Podgrupa 3. Chorzy z chłoniakiem Hodgkina – 14 chorych (16%),

Podgrupa 4. Chorzy z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego – 7 dzieci (8%).

Tabela 4. Rozpoznania w 4 podgrupach badanych chorych.

	Podgrupy chorych			
Rozpoznanie	Podgrupa 1	Podgrupa 2	Podgrupa 3	Podgrupa 4
Liczba chorych	39	26	14	7
Rozkład procentowy %	46	30	16	8



Wykres 5: Podgrupy chorych według rozpoznań.

Momentem włączenia chorych do badania była pierwotna diagnoza choroby nowotworu u 78 chorych, lub diagnoza wznowy nowotworu u 8 chorych.

II. Materiał badany.

Materiał do badań stanowiły:

1. Historie choroby pacjentów włączonych do badania.

Dane dotyczące odpowiedzi na leczenie w postaci całkowitej remisji (CR), progresji, wznowy i zgonu w przebiegu choroby nowotworowej, analizowano na podstawie prospektywnej obserwacji w okresie 6 lat, od marca 2008r do grudnia 2014r, średnio 41 miesięcy. Początek obserwacji chorych, to czas pierwszego pobrania próbek krwi do badań do analizy parametrów krzepnięcia.

2. Krew obwodowa.

Wszystkim chorym zakwalifikowanym do prowadzonego badania pobierano krew pełną w ilości 4ml, celem oceny stanu hemostazy w momencie rozpoznania pierwotnej choroby nowotworowej lub wznowy nowotworu, przed wdrożeniem procedur terapeutycznych. Chorych poddawano dodatkowej kontroli w następujących punktach czasowych:

- po zakończeniu terapii I linii przez chorego (w dalszej części pracy stosowano określenie „po zakończeniu leczenia”) i ustąpieniu ostrych powikłań leczenia oraz wykonaniu badań radiologicznych, średnio 4- 6 tygodni od daty podania ostatniego cyklu chemicznego.
- w momencie stwierdzenia progresji nowotworu. W przypadku niepomyślnego przebiegu choroby i zgonu chorego z powodu progresji nowotworu, analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o materiał biologiczny pobrany podczas diagnozy progresji lub wznowy choroby.

3. Materiał tkankowy.

Materiał tkankowy pochodzący z pobranych chirurgicznie tkanek nowotworowych od chorych w badanej grupie, zatopiony w parafinie i zgromadzony w Zakładzie Patomorfologii Podmiotu Leczniczego „Copernicus” w Gdańsku, (kierownik dr hab. med. Ewa Iżycka-Świeszewska).

III. Metodyka badań.

1. Ocena hemostazy.

Z pobranych próbek krwi obwodowej od wszystkich chorych oceniano:

1. morfologię z pomiarem liczby płytek krwi (PLT),

2. koagulogram z określeniem parametrów układu krzepnięcia, tj. wskaźnika protrombinowego, INR - międzynarodowego współczynnika znormalizowanego, czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), Fibrynogenu, D-dimeru, antytrombiny III.

Morfologia krwi i koagulogram były oznaczane rutynowo u pacjentów onkologicznych podczas diagnostyki i leczenia przeciwnowotworowego.

Pomiaru liczby płytek krwi dokonano w krwi pobranej (2ml) do probówki zawierającej antykoagulant w postaci wersenianu sodowo-potasowego (K2EDTA). Płytki krwi oceniano wyłącznie w momencie diagnozy choroby nowotworowej. Ze względu na dużą zmienność poziomu płytek w trakcie stosowanej terapii oraz toksyczny wpływ leków na ich produkcję w szpiku, odstąpiono o kontrolnego badania liczby płytek po zastosowanym leczeniu. Oznaczenia morfologii krwi przeprowadzano metodą impedancyjną w oparciu o analizator SF 3000 firmy Sysmex.

W celu określenia koagulogramu pobierano 2ml krwi do probówki zawierającej antykoagulant – 3,8% cytrynian sodowy w ilości określonej przez producenta zestawu analitycznego (rutynowo krew do probówki pobierana jest w stosunku 9:1, do ilości antykoagulantu zawartego w probówce). Probówka z krwią przed dokonaniem pomiaru czasów krzepnięcia poddawano wirowaniu z szybkością 2000xg obrotów przez 10-15 minut, celem oddzielenia surowicy od elementów morfotycznych. Parametry krzepnięcia oznaczano przy użyciu standardowej metody koagulometrycznej aparatem analitycznym BCS XP firmy Simens. Oznaczenia morfologii i koagulogramu dokonano w Laboratorium Centralnym, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) (kierownik Dr med. Krzysztof Lewandowski). W ocenie uzyskanych wyników posługiwano się normami obowiązującymi w Laboratorium Centralnym UCK (tabela 6).

Tabela 6. Normy badań koagulologicznych wg Laboratorium Centralnego, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

	Płytki krwi G/l	Wskaźnik protrombinowy %	INR	APTT sekundy	Fibrynogen g/l	D-dimer ug/l	AT III %
Zakres normy laboratoryjnej	130- 410	80-120	0,9- 1,3	26-36	1,8-3,5	<500	75-125

W momencie wykonywania badań koagulogramu w Laboratorium Centralnym UCK, wykonywano u pacjentów, również badania oceniające funkcję wątroby tj.:

- transaminaza alaninowa (Alat) i transaminaza asparaginowa (Aspat),
- stężenie białka całkowitego i albuminy, w oparciu o obowiązujące metody.

U wszystkich włączonych do badania stwierdzono prawidłowe wartości transaminaz oraz prawidłowe poziomy białka i albuminy w surowicy krwi.

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych analizowano w odniesieniu do następujących parametrów klinicznych i histologicznych:

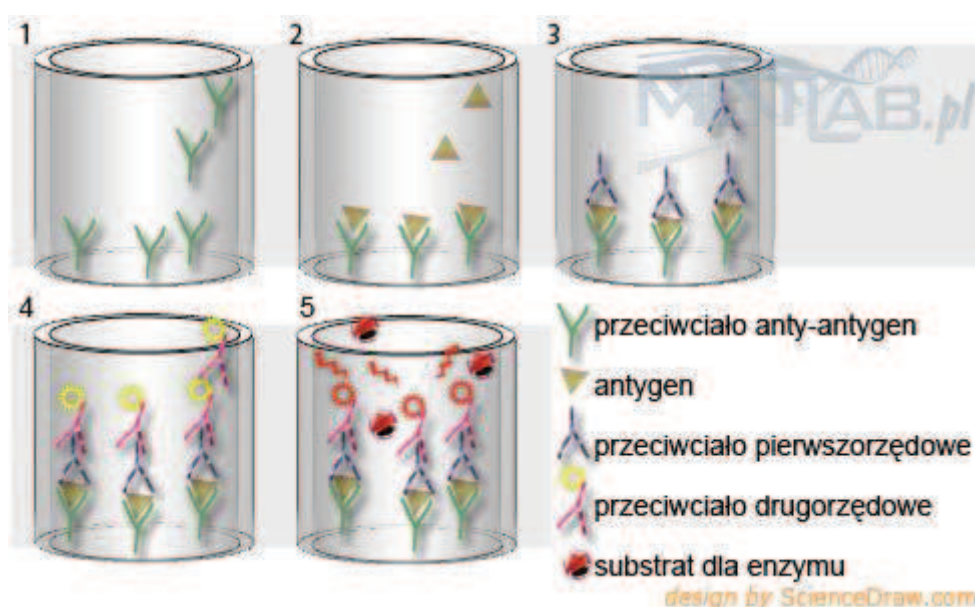
- stopień zaawansowania choroby nowotworowej,
- etap choroby (wznova lub pierwotne rozpoznanie),
- odpowiedź na leczenie (progresja choroby lub pozytywna odpowiedź - CR)
- typ histologiczny nowotworu.

2. Oznaczenia czynnika tkankowego (TF) metodą ELISA

Oznaczenia stężenia TF w surowicy przeprowadzono w oparciu o metodę immunoenzymatyczną (ELISA ang. enzyme-linked immunosorbent assay) w Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierownictwem Prof. dr hab. med. Jolanty Myśliwskiej. U każdego pacjenta z nowo rozpoznaną chorobą nowotworową oraz po zakończeniu leczenia, w remisji całkowitej, rozpoznaniu progresji lub wznowy choroby pobierano krew w ilości 2ml do sterylnej suchej probówki nie zawierającej antykoagulantu lub probówki z żelem separującym. Wszystkie pobrania krwi od chorych do prowadzonego badania odbywały się jednocześnie z innymi rutynowo wykonywanymi analizami laboratoryjnymi, po uzyskaniu zgody opiekunów prawnych. Pobraną krew, po wyrzepieniu, poddawano wirowaniu (wirówka automatyczna 3000 obrotów /min; 5 minut) uzyskując surowicę. Wyizolowana surowica była przenoszona przy pomocy pipet automatycznych, do sterylnych probówek typu Eppendorf, a następnie zabezpieczana poprzez zamrożenie w temp -70st C, do późniejszej analizy ELISA.

Oznaczeń dokonywano z zastosowaniem komercyjnego 96-dołkowy zestawu płytki badawczej opłaszczonej przeciwciałami monoklonalnymi anty-TF (*firma Abcam o nr katalogowym ab108903*), przeciwko badanej cytokinie. Cała procedura oznaczenia stężenia TF prowadzona była w temperaturze pokojowej. Celem poprawy wiarygodności prowadzonej analizy każdą surowicę badano dwukrotnie. Przed nałożeniem na płytkę badanych surowic, każdy element płytki został wypełniony roztworem rozcieńczającym (*Assay Diluent*) w ilości

100μl dołączonym do zestawu przez producenta. W następnym etapie na dołki płytki diagnostycznej nakładano dostarczone przez producenta standardy oraz rozmrożone surowice pacjentów i dzieci zdrowych w ilości 50μl na dołek (rozcieńczenie próbek badanych w stosunku 1:2). Tak przygotowaną płytkę poddawano dwugodzinnej inkubacji, po czym pięciokrotnie płukano każdy dołek płytki buforem płuczącym (*Wash Solution*) w ilości 200μl. Następnie do każdego dołka dodawano 50μl pierwszorzędowych biotynylowanych przeciwciał przeciwko substancji badanej (TF), które ponownie inkubowano przez 2 godziny i ponownie płukano. W kolejnym etapie do dołków dodawano po 50μl przeciwciał drugorzędowych - koniugat enzymatyczny Streptawidyna-Peroksydaza (SP), inkubowano przez 30 minut i ponownie przepłukiwano. Poprzez nieodwracalne połączenie biotyny ze streptawidyną następuje sprzężenie enzymu peroksydazy z substancją badaną – TF.



Rysunek: ELISA. 1-opłaszczanie płytki antygenem-przeciwciałem. 2-inkubacja z z badanym białkiem. 3-inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym (o wysokim powinowactwie do badanego białka). 4-inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym. 5-inkubacja z odpowiednim substratem powodująca reakcję. (met lab.pl/ELISA) (56).

Dodanie substratu dla peroksydazy – związek TMB (tetrametylo-benzydyna) w ilości 50μl i inkubowaniu przez 12 minut powoduje powstanie niebieskiej barwy w dołkach płytki. Po dodaniu 50μl kwaśnego związku (Stop Solution) reakcja enzymatyczna zostaje zatrzymana, powodując zmianę koloru roztworu w dołku na żółty. Intensywność żółtej barwy produktu barwnego w dołkach jest ściśle związana z ilością substancji badanej - TF w próbce. Przy użyciu metody pomiaru absorbancji światła spektrofotometrem o określonej długości fali

określa się stężenie substancji badanej. Pomiarów absorbancji w surowicach pacjentów dokonywano trzykrotnie przy długości fali 450nm czytnikiem płytek (Bio-Tek FL600; oprogramowanie KC4, BIO-TEK Instruments Inc.), a stężenie TF obliczano przy użyciu krzywej standardowej wykreślonej w trakcie testu dzięki dołączonym do zestawu standardom.

3. Badania patomorfologiczne

W Zakładzie Patomorfologii Podmiotu Leczniczego „Copernicus” w Gdańsku, przeprowadzono rutynowe badania histologiczne pobranych tkanek nowotworowych od dzieci w badanej grupie, celem określenia typu histologicznego nowotworu.

4. Badania immunohistochemiczne

W wyselekcjonowanej grupie 27 guzów (tabela nr 7), wykonano oznaczenia immunohistochemiczne (IHC) wybranych czynników związanych z układem krzepnięcia: czynnik tkankowy – TF, antytrombina III – AT III oraz czynnik krzepnięcia VIII – FVIII w wycinkach z guzów nowotworowych. O wyborze tych czynników w analizie immunohistochemicznej zadecydowała ich decydująca rola w fizjologicznym funkcjonowaniu hemostazy osoczowej. TF jest podstawowym czynnikiem inicjującym krzepnięcie po uszkodzeniu ściany naczynia, zaś AT III jest podstawowym markerem aktywności fibrynolizy. Badania przeprowadzono w Zakładzie Patologii i Neuropatologii GUMed, na podstawie materiału tkankowego zgromadzonego w Zakładzie Patomorfologii Podmiotu Leczniczego „Copernicus” w Gdańsku, (kierownik dr hab. med. Ewa Iżycka-Świeszewska).

Tabela 7. Rozpoznanie nowotworowe tkanek nowotworowych zastosowanych w badaniu.

Rozpoznanie	Guz Wilms’a	Mięsaki tkanek miękkich	Neuro-blastoma	Hepato-blastoma	Guz Ewing’a	Guzy germinalne
Liczba badanych guzów	8	8	7	2	1	1

Na podstawie archiwalnych preparatów, wybarwionych hematoksyliną-eozyną (H-E) dokonano wyboru reprezentatywnych wycinków z guzów. Do badań IHC wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w buforowanej 10% formalinie, zatopiony w parafinie. Następnie posłużono się metodą mikromacierzy tkankowych, w oparciu o komercyjny zestaw Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray System, firmy Sakura Finetek USA, Inc. Z bloków tkankowych, z miejsca najbardziej histopatologicznie reprezentatywnego (bez zmian

martwiczych i uszkodzeń) wycinano, stosując *Punch Tips*, walce tkankowe średnicy 3mm. Pobraną tkankę przenoszono na parafinowo- polimerową płytkę mikromacierzy (*Recipient Block*), zawierającą 30 dołków w układzie 5x6 otworów o średnicy 3mm. Następnie całość scalono w cieplarni o temp. 60° C w czasie 30 min. Po tym czasie płytkę zalano parafiną, która po wystudzeniu utworzyła blok tkankowy. Przy pomocy mikrotomu saneczkowego z bloku tkankowego mikromacierzy skrojono skrawki tkankowe grubości 4 µm, które umieszczono na szkiełkach adhezyjnych (silanizowanych) *Microscope Slides FLEX* firmy Dako, nr kat. K8020.

Tkanki kontrolne (pozytywne) w badaniu stanowiły wycinki z nienowotworowej tkanki nerki, łożyska i skóry. Kontrolą negatywną były preparaty bez nałożonego przeciwciała pierwotnego.

4a. Analiza immunohistochemiczna wybranych markerów.

Przeprowadzono badania immunohistochemiczne wybranych markerów układu krzepnięcia TF i AT III w komórkach nowotworowych oraz w naczyniach nowotworowych. Immunofenotypizacja przeprowadzona została przy użyciu systemu detekcji *EnVision Flex* firmy Dako, (nr kat. K8002).

Etapy:

1. Odparafinowanie, nawadnianie i ciepłe odmaskowanie epitopu (HIER) przeprowadzono w module Pt-link przy udziale buforu *Target Retrieval Salution* (nr S3308) (50x) Tris/EDTA pH 9, w temp. 97° C w czasie 20 min.

2. Blokowanie endogennej peroksydazy - odczynnikiem *Peroxidase-Blocking Reagent* (nr SM 801).

3. Inkubacja 30 minut w temperaturze pokojowej z przeciwciałem pierwotnym w rozcieńczeniu:

- Anti Antithrombin III Ms mAb [BDI205] ab 20933 1: 200,

- Anti Tissue Factor Ms mAb [2K1] ab 17375 1: 50,

- Anti-Factor VIII Ms mAb [2.2.9] ab 41186 1:25,

- Anti-CD31 Ms JC70A firmy Dako M0823 1:20.

Do rozcieńczenia przeciwciał użyto *Diluent* firmy Dako (nr kat. K8006).

4. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym anty - mysim skoniugowanym z polimerem znakowanym HRP (nr SM 802). Inkubacja 20 min. w temperaturze pokojowej.

5. Reakcja barwna. Inkubacja 10 min. w temp. pokojowej z DAB-chromogen (diaminobenzzydina, nr DM 827), rozcieńczony w roztworze buforującym (*Substrate Buffer*)

zawierającym nadtlenek wodoru, (nr SM 803).

6. Podbarwienie jąder komórkowych Hematoksyliną Mayera – 5 min

Do przemywania skrawków użyto Wash Buffer (20x) (roztwór soli fizjologicznej z buforem Tris o pH 7,6 oraz wody dejonizowanej (nr DM 831).

Mikroskopowa analiza immunohistochemiczna badanych antygenów: czynnika tkankowego (TF) oraz antytrombiny III (AT III) w komórkach nowotworowych, przeprowadzona została metodą półilościową. Określano intensywność odczynu: słaby „+”, umiarkowany „++”, silny „+++” oraz procentową ilość komórek nowotworowych ze stwierdzoną reakcją barwną: rozlaną = 66-100% komórek, umiarkowaną = 33-66% komórek oraz ograniczoną zawierającą poniżej 33% komórek. W analizie statystycznej odczynów histopatologicznych tkanki nowotworowej posługiwano się sporządzoną skalą własną zawartą w tabeli nr 8.

Tabela 8. Ocena odczynów immunohistochemicznych w komórkach nowotworowych.

		Procent komórek guza z dodatnim odczynem immunohistochemicznym		
Siła odczynu		66-100%	33-66%	<33%
	Silny +++	9	6	3
	Umiarkowany ++	8	5	2
	Słaby +	7	4	1

(IHC – immunohistochemiczny)

W przypadku gdy w tkance nowotworowej nie występowała żadna reakcja barwna z odczynnikami badanym, to w analizie statystycznej przypisywano wartość zero. Na podstawie powyższej tabeli nr 8, słabą reakcję immunohistochemiczną opisywały wartości od zera do czterech, umiarkowaną – wartości od 5 do 7, zaś silną punkty 8 – 9.

W ścianie naczyń nowotworowych określono siłę ekspresji wybranych antygenów. Ponownie oznaczano antytrombinę III i czynnik tkankowy (TF), a dodatkowo posłużono się markerami lokalizującymi naczynia krwionośne w tkance: czynnik krzepnięcia VIII (FVIII) oraz płytkowo-śródbłonkową cząsteczką adhezji komórkowej - CD31. Ekspresja odczynów immunohistochemicznych w naczyniach prowadzona była przez półilościowe stwierdzenie intensywności reakcji barwnej badanego odczynu: słaby „+”, umiarkowany „++”, silny „+++”.

5. Metody statystyczne.

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet oprogramowania statystycznego Statistica.pl 10, firmy StatSoft. W wynikach analiz statystycznych podano obliczony poziom istotności statystycznej (p) weryfikowanej hipotezy zerowej. Wartości $p < 0,05$ interpretowano jako znamienne statystycznie.

Analizę zmian parametrów w całej obserwowanej grupie przed i po leczeniu wykonano za pomocą testów T dla zmiennych zależnych. Dla analizy wpływu różnych czynników na zmiany parametrów wykonywano analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami lub nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala Wallisa. Do porównań wyników badań histochemicznych wykonywano analizę za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya lub w przypadku porównań częstości występowania wykonywano test χ^2 wprowadzając poprawkę Yatesa, gdy liczebność oczekiwana podgrupy była mniejsza od 10.

Wyniki

I. Analiza materiału klinicznego.

Analizie klinicznej poddano 86 pacjentów Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii GUMed leczonych w latach 2008-2014r z powodu rozpoznania choroby nowotworowej. W grupie badanej przeważali chłopcy - 49 (57%), w stosunku do 37 dziewcząt (43%). Wiek pacjentów wahał się od pięciu dni do 18 lat (średni wiek 8 lat i 6 miesięcy, mediana 7 lat i 3 miesiące). Chorzy w wieku 0-3 lat i 14-18 lat, byli najczęściej reprezentowani.

Ośmiu (9%) chorych w momencie włączenia do badania znajdowało się w fazie wznowy choroby nowotworowej, a u pozostałych pacjentów po raz pierwszy postawiono rozpoznanie nowotworu złośliwego. Większość – 51 chorych (59%) demonstrowało chorobę zlokalizowaną, natomiast 27 dzieci (32%), było w stadium rozsianym choroby nowotworowej.

Tabela 9. Stadium kliniczne choroby nowotworowej w badanej grupie.

	Stadium zlokalizowane	Stadium rozsiane
Liczba chorych	51	27
Rozkład procentowy %	59	32

Obserwację kliniczną pacjentów prowadzono od momentu włączenia do badania do jej zakończenia w grudniu 2014r. Był to okres od 7 do 81 miesięcy – średnio 41 miesięcy. W trakcie prowadzonej prospektywnej obserwacji klinicznej, u 57 (66%) chorych uzyskano pozytywną odpowiedź na leczenie w postaci całkowitej remisji (CR), progresję choroby nowotworowej stwierdzono u 29 dzieci (34%), spośród których 23 (27%) zmarło z powodu postępu choroby.

II. Analiza wskaźników laboratoryjnych hemostazy.

1. Płytki krwi

Oznaczenie liczby płytek krwi wykonano u wszystkich badanych uzyskując 86 wyników. Średnia wartość płytek krwi w momencie diagnozy wyniosła 363,826 tys./ul (SD 138,219 tys./ul), z wartością minimalną 25tys/ul oraz maksymalną 947tys/ul. W trzech przypadkach oznaczenia płytek były niższe od dolnej granicy normy (N= 150-410tys/ul).

Dotyczyło to dwóch chorych w rozsiałym stadium choroby (chorzy z rozpoznaniem mięsaka prążkowanokomórkowego podtyp pęcherzykowy oraz rdzeniaka zarodkowego) z obecnością przerzutów w szpiku kostnym oraz jednego chłopca z zaawansowanym guzem Wilms'a i obecnością czopu nowotworowego w żyłę głównej dolnej. W przypadku 24 chorych liczba płytek przekroczyła górną granicę normy. Chorzy z nadpłytkowością różnili się rozpoznaniem i znajdowali się w różnych stadiach zaawansowania choroby. Charakterystykę przedstawia tabela nr 10.

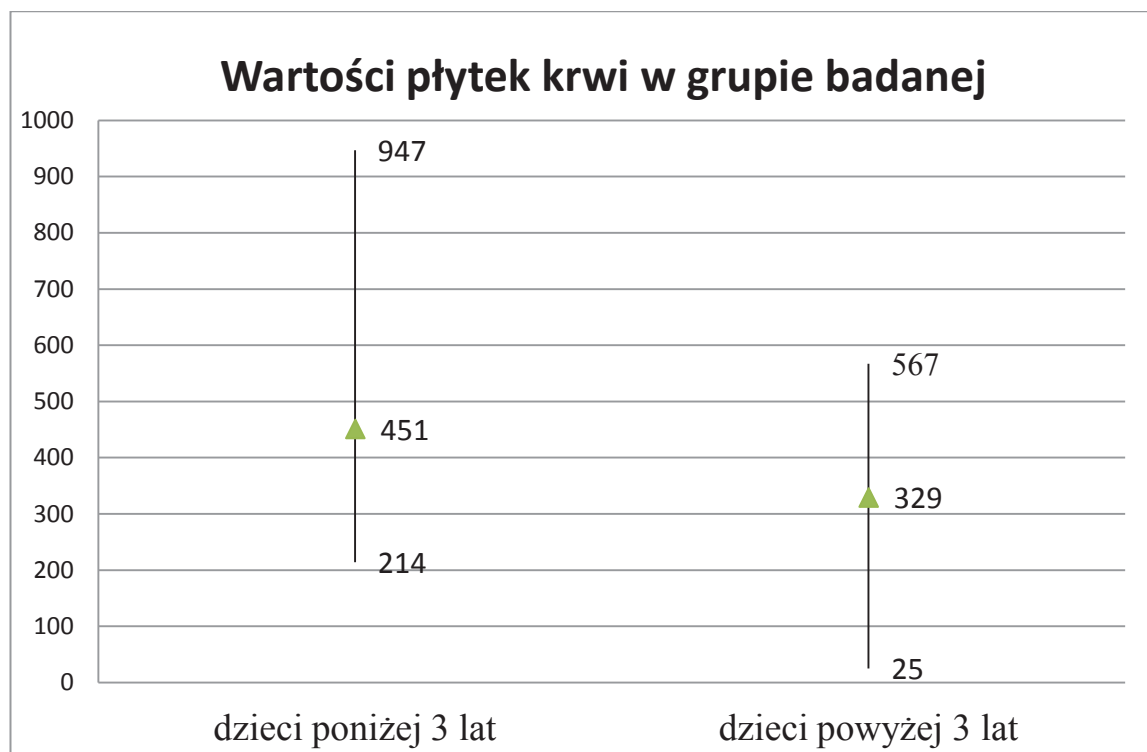
Tabela 10. Charakterystyka chorych z nadpłytkowością.

Lp.	Liczba płytek krwi (rosnąco) (tys./ul)	Wiek	Zaawansowanie choroby	Rozpoznanie
1	413	4 lata 5 miesięcy	Lokalne	Neuroblastoma
2	414	17 lat 8 miesięcy	Lokalne	HD
3	419	16 lat 11 miesięcy	Lokalne	HD
4	425	2 lata 11 miesięcy	Uogólnione	Guz Kości
5	435	11 miesięcy	Lokalne	Neuroblastoma
6	437	3 miesiące	Uogólnione	Neuroblastoma
7	440	5 lat 3 miesiące	Lokalne	MTM
8	443	2 miesiące	Uogólnione	Neuroblastoma
9	445	1 miesiąc	Lokalne	Neuroblastoma
10	449	2 miesiące	Uogólnione	Neuroblastoma
11	462	2 miesiące	Lokalne	MTM
12	471	15 lat	Uogólnione	MTM
13	476	15 lat 6 miesięcy	Lokalne	HD
14	487	15 lat 4 miesiące	Lokalne	HD
15	493	6 lat 2 miesiące	Uogólnione	Guz Wilms'a
16	517	6 lat	Uogólnione	Hepatoblastoma
17	520	3 lata 2 miesiące	Lokalne	Guz Wilms'a
18	548	16 lat 10 miesięcy	Uogólnione	HD
19	551	1 rok 5 miesięcy	Uogólnione	MTM
20	567	4 lata 7 miesięcy	Lokalne	Guz Wilms'a
21	607	4 miesiące	Lokalne	Guz germinalny
22	720	10 miesięcy	Uogólnione	Hepatoblastoma
23	820	1 rok 1 miesiąc	Uogólnione	Neuroblastoma
24	947	2 lata 2 miesiące	Uogólnione	Hepatoblastoma

(HD – Chłoniak Hodgkina, MTM – mięsak tkanek miękkich)

W grupie dzieci najmłodszych, w wieku poniżej 3 lat (24 z 86 chorych), wartość płytek krwi w chwili rozpoznania wahała się od 214 do 947tys./ul, ze średnią wartością przekraczającą granice normy, wynoszącą 451tys./ul. Natomiast w grupie pacjentów powyżej

3 lat (62 z 86 chorych), wartość płytek krwi wynosiła 25 - 567tys./ul, a średnia wartość - 329tys/ul, mieściła się w granicach normy.



Wykres 6. Wartości płytek krwi (tys/ul) w grupie badanej w zależności od wieku.

Zwraca uwagę, że najwyższe wartości płytek stwierdzono u najmłodszych chorych (wiek 0-3 lata), w podgrupie pierwszej z guzami pochodzenia płodowego (dwa przypadki wątrobiaka zarodkowego i jeden zwojaka zarodkowego współczulnego). Byli to pacjenci w czwartym stopniu zaawansowania.

2. Wskaźnik protrombinowy.

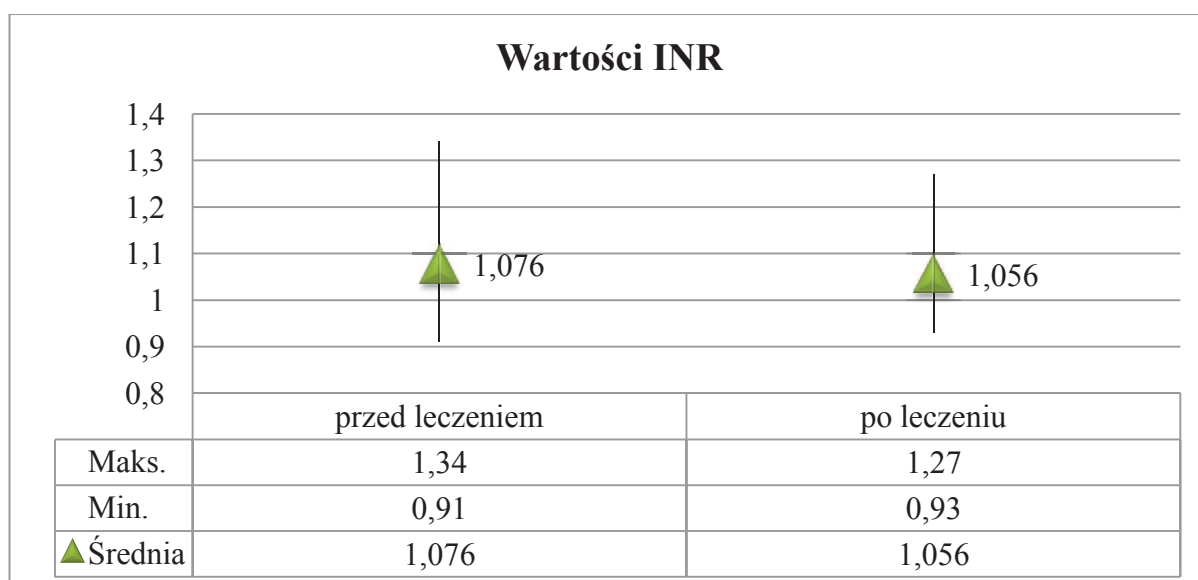
Wskaźnik protrombinowy oznaczono przed leczeniem i po leczeniu onkologicznym u 81 dzieci. U wszystkich dzieci badania laboratoryjne: transaminazy oraz stężenie białka całkowitego i albumin, potwierdziły prawidłową funkcję wątroby. Wartości wskaźnika przed leczeniem wynosiły od 78 do 110%, średnio 95,827% (SD 7,311). Tylko u jednego chorego z rozpoznaniem guza Wilms'a, z czopem nowotworowym w żyle głównej dolnej i wytworzonym krążeniem obocznym, wartość wskaźnika protrombinowego była obniżona i wynosiła 78% (N: 80-120%). Po leczeniu onkologicznym wartości wskaźnika wahały się w zakresie od 79 do 112%, średnio 97,16% (SD 6,659). W badaniach po leczeniu wznowy u jednego chorego z rozpoznaniem nowotworu ośrodkowego układu nerwowego, stwierdzono obniżoną wartość wskaźnika do 79%. Porównując średnie wartości przed i po leczeniu

stwierdzono jedynie nieznamienny ($p=0,18$) wzrost średniej wartości wskaźnika protrombinowego.

3. INR

Wartości parametrów INR i wskaźnika protrombinowego są ze sobą wzajemnie powiązane, stąd uzyskana analiza wyników INR w całej badanej grupie, była potwierdzeniem wyników analizy wskaźnika protrombinowego.

Wyniki INR – międzynarodowego współczynnika znormalizowanego, uzyskano u 81 chorych. Wartości przed leczeniem onkologicznym wahały się od 0,91 do 1,34, średnio 1,076 (SD 0,081). Po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym wyniki INR kształtowały się w zakresie od 0,93 do 1,27, średnio 1,056 (SD 0,075). Wszystkie uzyskane wyniki badań pozostawały w granicach normy.



Wykres 7. Wartości wskaźnika INR w grupie badanej przed i po leczeniu onkologicznym.

Stwierdzenie obniżenia średnich wartości INR po zastosowanym leczeniu onkologicznym w porównaniu do wartości wyjściowych, potwierdziło obserwację zmian w odniesieniu do wskaźnika protrombinowego, a różnice były na granicy znaczącości statystycznej ($p=0,079$).

4. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT)

Ten parametr oznaczono u 80 dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej. Przed leczeniem czas APTT wahał się w granicach od 22 do 48 sekund, średnio 33,475 sekundy (SD 4,889). W chwili diagnozy u trzech pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich,

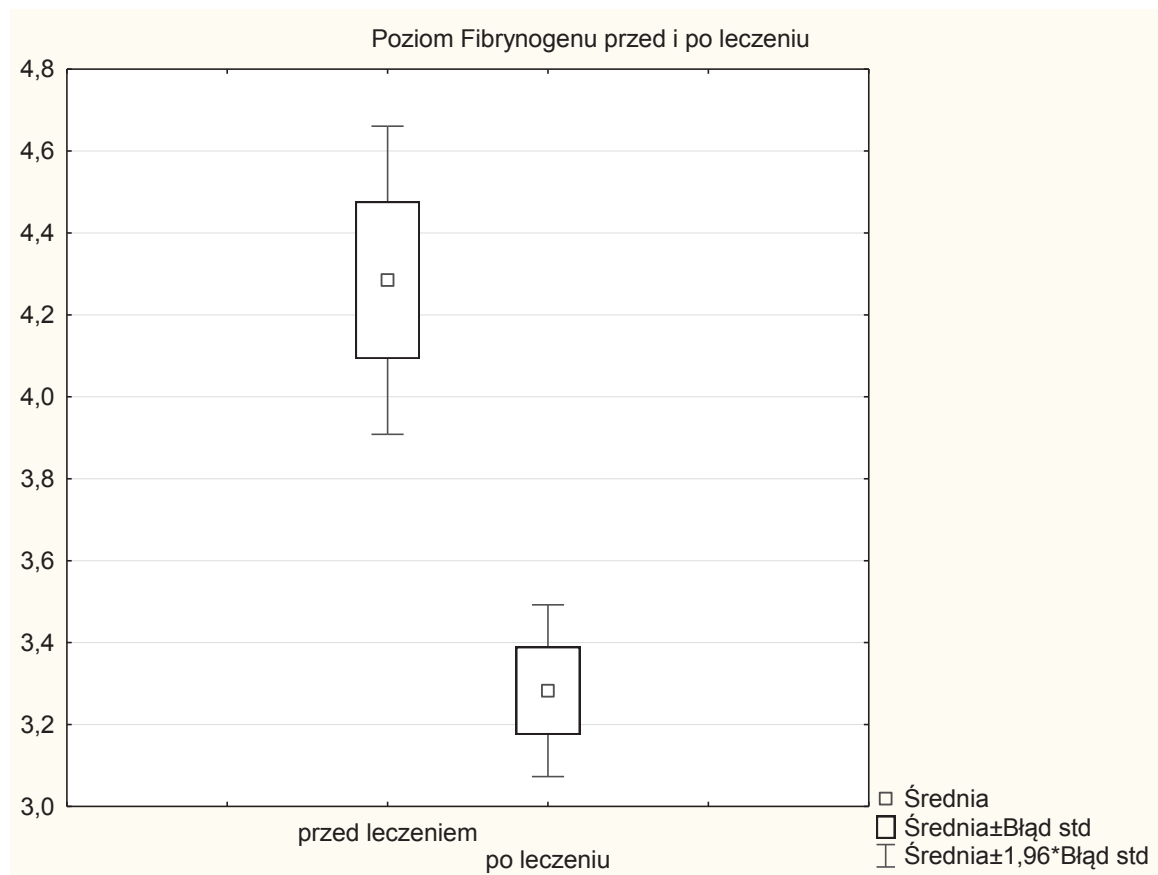
czas APTT były skrócone, a u 18 był dłuższy od normy laboratoryjnej (N: 26 – 36 sekund). Chorzy z wydłużonym czasem APTT przed leczeniem, różnili się rozpoznaniem. Najdłuższy czas APTT (46 i 48 sekund) w momencie diagnozy odnotowano w dwóch przypadkach rozsiańszych mięsaków tkanek miękkich. Po leczeniu onkologicznym wartości APTT w grupie badanej wynosiły: minimalna 23, maksymalna 45 sekund, średnia 32,55 sekundy (SD 4,794). Stwierdzono po leczeniu onkologicznym, u czterech chorych: skrócenie czasu, a u 13 chorych wydłużenie czasu APTT w stosunku do normy. Skrócenie czasu wystąpiło u trzech pacjentów w momencie stwierdzenia progresji choroby nowotworowej (jeden mięsak tkanek miękkich, dwa guzy OUN) i u jednego dziecka z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina, u którego uzyskano całkowitą remisję choroby. Wydłużenie czasu APTT po leczeniu najczęściej stwierdzano w grupie pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich (5 chorych). Spośród 13 chorych z wydłużeniem czasu APTT po leczeniu onkologicznym pierwszej linii, aż siedmiu zmarło z progresji choroby w dalszej obserwacji klinicznej. Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w pomiarze czasu APTT przed i po leczeniu ($p=0,215$).

5. Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu w surowicy krwi zostało oznaczone u 77 dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej. Wartości kształtowały się w granicach od 0,98 do 8,79g/l, średnia 4,285g/l (SD 1,684). W chwili diagnozy, w przypadku 2 chorych wykazano obniżenie stężenia fibrynogenu poniżej normy (N= 1,8 – 3,5g/l), a u 42 stężenie przekroczyło górną granicę normy. Najniższą wartość - 0,98g/l w momencie rozpoznania, stwierdzono u chorej z rozsiałym wykrzepianiem śródnaczyniowym (DIC) w przebiegu mięsaka tkanek miękkich. U opisywanej chorej inne parametry krzepnięcia również były nieprawidłowe: niska wartość płytek (25tys./ul), wydłużony czas APTT (46 sekund) oraz wysoki poziom D-dimerów (7760ug/l), co potwierdzało rozpoznanie DIC. U drugiego chorego z niską wartością fibrynogenu w momencie diagnozy rozpoznano masywny nowotwór wątroby, obejmujący większą część narządu. Najwyższą średnią wartość fibrynogenu (5,426g/l) w momencie rozpoznania stwierdzono w podgrupie chorych z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina. Ponadto u chorych z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, jak rozpoznanie wznowy, obecność przerzutów, a w późniejszej obserwacji stwierdzana progresja i zgon, średnia wartość fibrynogenu także była wysoka.

Po leczeniu onkologicznym stężenia fibrynogenu wahały się od 1,51 do 6,08g/l, a średnia wyniosła 3,282g/l, (SD 0,939). W przypadku 19 chorych stężenie fibrynogenu po zakończonym leczeniu przekraczało górny zakres normy. U 45% tych chorych przed

leczeniem, również stwierdzono podwyższone wartości stężenia fibrynogenu w surowicy. Byli to chorzy z zaawansowanymi nowotworami, w większości o niepomyślnym dalszym przebiegu choroby (11 z 19 chorych) w czasie prowadzonej obserwacji. **Średnie wartości stężenia fibrynogenu przed leczeniem, u dzieci z rozpoznaniem choroby nowotworowej, były istotnie wyższe w porównaniu do wartości fibrynogenu po leczeniu onkologicznym ($p < 0,01$).**

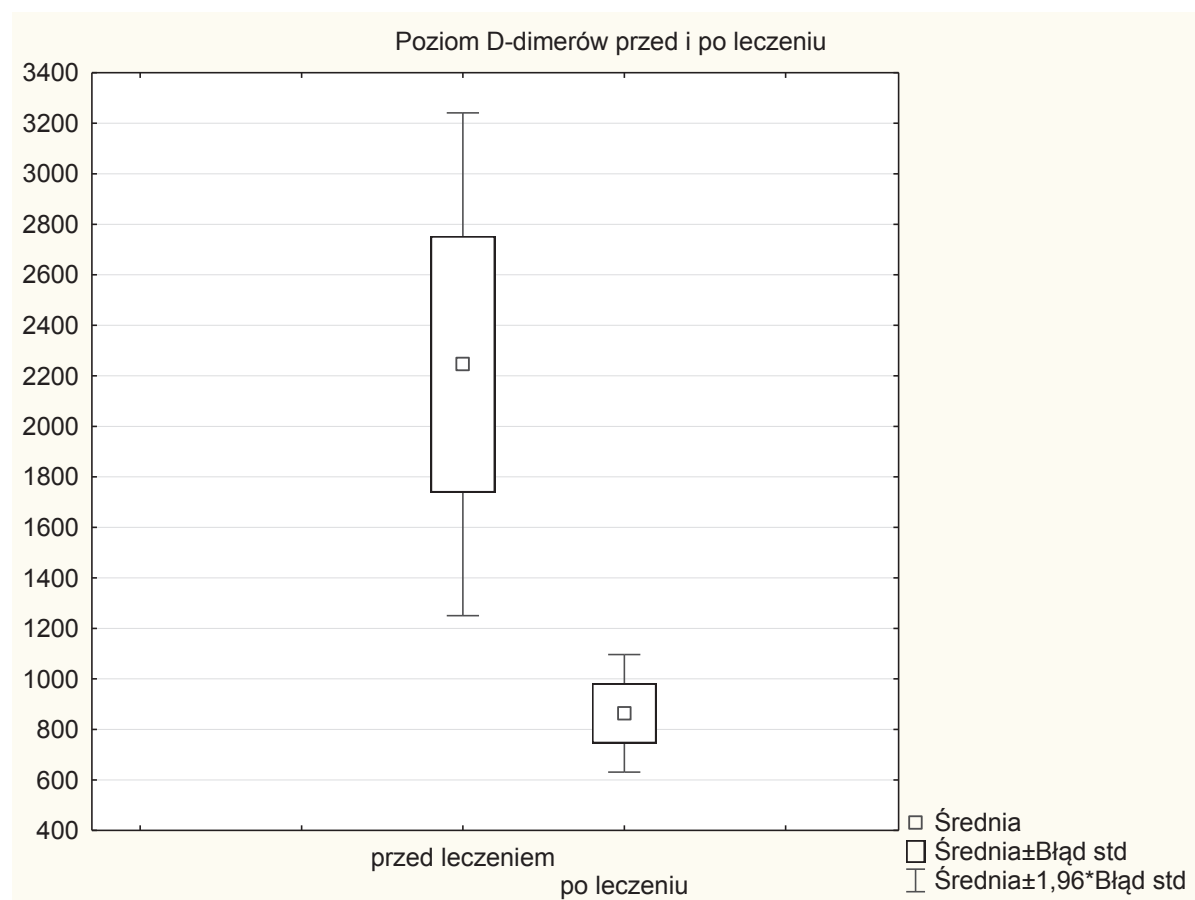


Wykres 8. Wartości stężenia fibrynogenu (g/l) przed i po leczeniu przeciwnowotworowym.

6. D-dimer

Stężenia D-dimeru, zostały oznaczone u 64 pacjentów. W chwili diagnozy wartości tego parametru kształtowały się w szerokim zakresie od 113 do 25 681 ug/l, a średnia wyniosła 2245,719 ug/l (SD 4062,677). W momencie diagnozy u większości chorych stężenie przed leczeniem przekraczało granice prawidłowe ($N: < 500 \text{ ug/l}$). Po leczeniu obserwowano obniżenie wartości D-dimeru, choć u 47% chorych nadal przekraczały wartości prawidłowe. Wartości po leczeniu wahały się w granicach od 71 do 4390 ug/l, a średnia wartość wyniosła 863,609 ug/l (SD 948,617). **Po zastosowanym leczeniu onkologicznym stwierdzono**

znamiennie statystycznie obniżenie stężenia D-dimeru w porównaniu z wartościami w momencie diagnozy ($p < 0,01$).



Wykres 9. Stężenia D-dimerów (ug/l) przed i po zastosowanym leczeniu onkologicznym.

7. Antytrombina III (AT III)

Kolejnym analizowanym w surowicy krwi parametrem układu krzepnięcia była antytrombina III, której aktywność określono u 67 chorych dzieci. Rozpiętość wartości AT III w chwili diagnozy nowotworu wahała się od 53 do 126%, średnia wyniosła 99,597% (SD 14,41). Wartości AT III u czterech chorych znajdowały się poniżej dolnego zakresu normy oraz u jednego powyżej górnej granicy normy ($N = 75-125\%$). Obniżenie poziomu AT III stwierdzono w grupie czterech niemowląt z rozpoznaniem nowotworów pochodzenia płodowego, zaś aktywność przekraczającą górną granicę normy stwierdzono u chorego z guzem Wilms'a. Po zakończeniu leczenia onkologicznego wartości AT III wynosiły od 65 do 125%, średnia 100,91% (SD 13,944). U czterech chorych ze złą odpowiedzią na leczenie, w progresji choroby nowotworowej, wyniki aktywności AT III były obniżone w stosunku do normy laboratoryjnej. Byli to chorzy z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich, nowotworu OUN, wątrobiaka zarodkowego i chłoniaka Hodgkina. Żaden pomiar nie przekroczył górnej

granicy normy. Nie stwierdzono znamiennych różnic wartości AT III w odniesieniu do badanych punktów czasowych. ($p=0,549$).

Zbiórce dane dotyczące oznaczeń koagulologicznych przed i po leczeniu onkologicznym w badanej grupie chorych w wieku rozwojowym, przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Wartości oznaczeń parametrów układu krzepnięcia u dzieci przed i po leczeniu onkologicznym.

	Badanie	Liczba oznaczeń	Średnia	Odchylenie standardowe	P
wsk. Protrombinowy	Przed leczeniem		95,827	7,311	0,184050
wsk. Protrombinowy	Po leczeniu	81	97,160	6,659	
INR	Przed leczeniem		1,076	0,081	0,079074
INR	Po leczeniu	81	1,056	0,075	
APTT	Przed leczeniem		33,475	4,889	0,215168
APTT	Po leczeniu	80	32,550	4,794	
Fibrynogen	Przed leczeniem		4,285	1,684	0,000005
Fibrynogen	Po leczeniu	77	3,282	0,939	
D-dimer	Przed leczeniem		2245,719	4062,67	0,007614
D-dimer	Po leczeniu	64	863,609	948,617	
AT III	Przed leczeniem		99,597	14,410	0,549869
AT III	Po leczeniu	67	100,910	13,944	

INR – międzynarodowy współczynnik znormalizowany, APTT – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, AT III – antytrombina III.

A. Analiza parametrów krzepnięcia w zależności od rozpoznania histopatologicznego.

Analizie poddano wszystkie badane parametry hemostazy: płytki krwi, wskaźnik protrombinowy, APTT, D-dimer, AT III w wyznaczonych czterech podgrupach chorych i odniesiono do rozpoznań histopatologicznych.

1. Płytki krwi

Wartości średnie płytek krwi w momencie diagnozy, w czterech utworzonych podgrupach chorych według rozpoznań wahały się od 240,286 do 398,436 tys./ μ l i wszystkie mieściły się w granicach normy laboratoryjnej. Najniższą średnią liczbę płytek stwierdzono w grupie nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, a najwyższą w grupie nowotworów pochodzenia zarodkowego (tabela 12).

Tabela 12. Wartości płytek krwi u chorych w czterech podgrupach rozpoznań.

Etap choroby	Wartości badane	Płytki krwi (tys./ μ l)			
		Nowotwory OUN	Mięsaki i guzy kości	Guzy zarodkowe	Chłoniak Hodgkina
Przed Leczeniem	Min	147	25	119	254
	Średnie	240,286	334,846	398,436	383
	Max	391	551	947	548
Liczba chorych		7	26	39	14

(OUN – Ośrodkowy układ nerwowy)

Średnie wartości płytek krwi w ustalonych podgrupach chorych według rozpoznań histologicznych różniły się znamienne (p=0,013).

2. Wskaźnik protrombinowy.

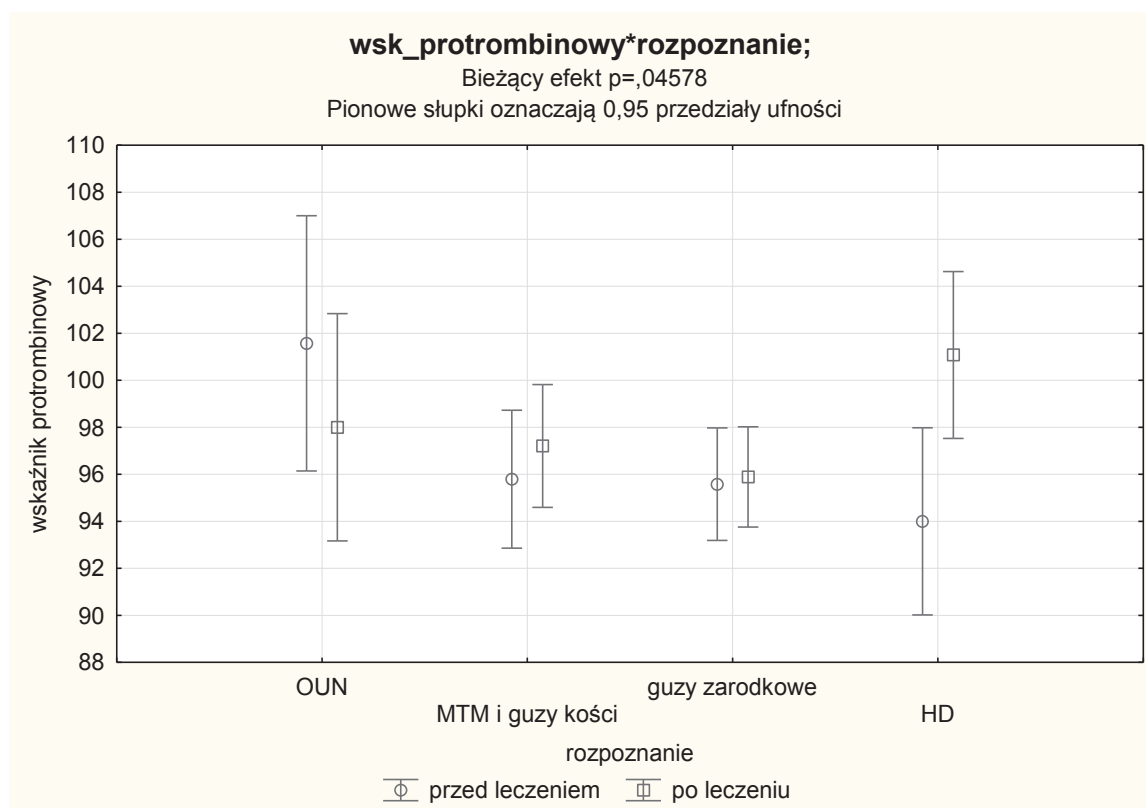
Analizę wartości wskaźnika protrombinowego w czterech podgrupach chorych przed i po zakończeniu terapii nowotworu przedstawiono w tabeli 13. W żadnej grupie analizowanych chorych średnie wartości wskaźnika protrombinowego nie przekraczały zakresu wartości prawidłowych. Najwyższa średnia wartość wskaźnika przed leczeniem nowotworu występowała w podgrupie z nowotworami OUN (101,5714%), a najniższa w podgrupie z rozpoznaniem choroby Hodgkina (94,0714%). Obniżoną poniżej normy, wartość stwierdzono w przypadku jednego pacjenta z rozpoznaniem nerczaka płodowego z czopem nowotworowym w żyłę głównej dolnej. Różnice w podgrupach, w zależności od rozpoznania histo-patologicznego, nie były statystycznie znamienne. Po leczeniu onkologicznym najwyższą średnią wartość wskaźnika protrombinowego stwierdzono u chorych z chłoniakiem Hodgkina (101,0769%), a najniższą w podgrupie z rozpoznaniem guzów zarodkowych – 95,5945%. Wynik badania po leczeniu, jedynie u jednego pacjenta z rozpoznaniem progresji nowotworu ośrodkowego układu nerwowego, wykazał wartość poniżej normy (79%), a pozostałe mieściły się w granicach prawidłowych. W grupie chorych z guzami zarodkowymi,

średnie wartości badanego wskaźnika wykazały najmniejsze zmiany po zastosowanym leczeniu.

Tabela 13. Wartości wskaźnika protrombinowego w czterech podgrupach w zależności od rozpoznania nowotworu, przed i po leczeniu onkologicznym.

Etap choroby	Wartości badane	Wskaźnik protrombinowy (%) w podgrupie			
		Nowotwory OUN	Mięsaki i guzy kości	Guzy zarodkowe	Chłoniak Hodgkina
Przed Leczeniem	Min	94	82	78	83
	Średnie	101,5714	95,7916	95,4054	94,0714
	Max	106	107	110	107
Po Leczeniu	Min	79	83	84	93
	Średnie	98	97,2083	95,5945	101,0769
	Max	111	107	107	112
Liczba chorych		7	24	37	13

Po leczeniu onkologicznym stwierdzono obniżenie średniej wartości wskaźnika protrombinowego w podgrupie z guzami OUN (o 3,57%), zaś w podgrupie z mięsakami i chłoniakiem Hodgkina wartości tego parametru wzrosły. Średnie wartości nie uległy zmianie w grupie guzów pochodzenia zarodkowego. W przypadku chorych z rozpoznaniem choroby Hodgkina średnia wartość wskaźnika protrombinowego wzrosła o 7%, w grupie z mięsakami o 1,4167%. **Różnice wartości wskaźnika protrombinowego przed i po leczeniu, pomiędzy podgrupami: nowotwory OUN, mięsaki i guzy kości, guzy zarodkowe, chłoniak Hodgkina, były statystycznie istotne ($p < 0,05$).**



Wykres 10. Wartości wskaźnika protrombinowego przed i po leczeniu w zależności od podgrupy wg rozpoznania (OUN – nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, MTM – mięsaki tkanek miękkich, HD – choroba Hodgkina).

3. Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu oznaczono u 77 chorych. Wartości stężenia fibrynogenu w surowicy krwi w przypadku większości chorych były wyższe przed rozpoczęciem leczenia, niż po jego zakończeniu, za wyjątkiem chorych z rozpoznaniem mięsaków tkanek miękkich i hepatoblastoma. Przed leczeniem wartości średnie we wszystkich podgrupach przekraczały ustalony zakres normy. Najniższą średnią wartość fibrynogenu (3,6647g/l) przed leczeniem stwierdzono w grupie z rozpoznaniem mięsaków i guzów kości, a najwyższą (5,426g/l) w grupie z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina. Po zakończeniu leczenia średnie wartości fibrynogenu obniżyły się i wahały się od 3,068 g/l (podgrupa nowotworów OUN), do 3,6109g/l (podgrupa mięsaków i guzów kości) (tabela 14).

Tabela 14. Wartości fibrynogenu w podgrupach przed i po leczeniu onkologicznym.

Etap choroby	Wartości badane g/l	Podgrupy chorych z			
		Nowotworami OUN	Mięsakami i guzami kości	Guzami zarodkowymi	Chorobą Hodgkina
Przed Leczeniem	Min	2,22	0,98	1,55	2,17
	Średnie	4,453	3,6647	4,2013	5,426
	Max	7,3	8,47	8,33	8,79
Po Leczeniu	Min	1,51	1,8	1,8	1,96
	Średnie	3,068	3,6109	3,1925	3,116
	Max	4,0	5,69	6,08	5,45
Liczba chorych		7	21	36	13

(OUN – ośrodkowy układ nerwowy)

Po leczeniu onkologicznym średnie stężenia fibrynogenu w grupach z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego, nowotworami zarodkowymi, chłoniakiem Hodgkina, były niższe niż w momencie rozpoznania. Te **różnice były istotne statystycznie ($p < 0,00001$)**. Średnie stężenie fibrynogenu w grupie mięsaków i guzów kości po terapii było wyższe, niż w pozostałych rozpoznaniach i wartości te różniły się **znamiennie od stężeń fibrynogenu w pozostałych porównywanych podgrupach chorych ($p = 0,003$)**. U 10 z 21 pacjentów tej grupy, po leczeniu nadal stwierdzano wartości fibrynogenu przekraczające górną granicę normy, zaś sześcioro z tych chorych w dalszej obserwacji zmarło z progresji choroby.

Nie zaobserwowano zmian w pozostałych parametrach układu krzepnięcia przed i po leczeniu: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), D-dimer, antytrombina III w żadnej z czterech podgrup badanych dzieci.

B. Porównanie parametrów krzepnięcia u dzieci z pierwotnym zachorowaniem i we wznowie choroby nowotworowej.

1. Płytki krwi

Przed rozpoczęciem leczenia, wartości płytek krwi u 78 chorych z pierwotnym rozpoznaniem nowotworu kształtowały się w zakresie od 25 do 947 tys./ μ l, a średnia wynosiła 373,692 tys./ μ l. W grupie chorych ze wznową nowotworu liczba płytek krwi wahała się od 147 do 389 tys./ μ l. Średnia wartość płytek krwi wyniosła 267,625 tys./ μ l. W obu grupach chorych, średnia wartość płytek mieściła się w ustalonych granicach normy. **Wyższą średnią liczbę płytek krwi stwierdzono u pacjentów z pierwotnym rozpoznaniem choroby**

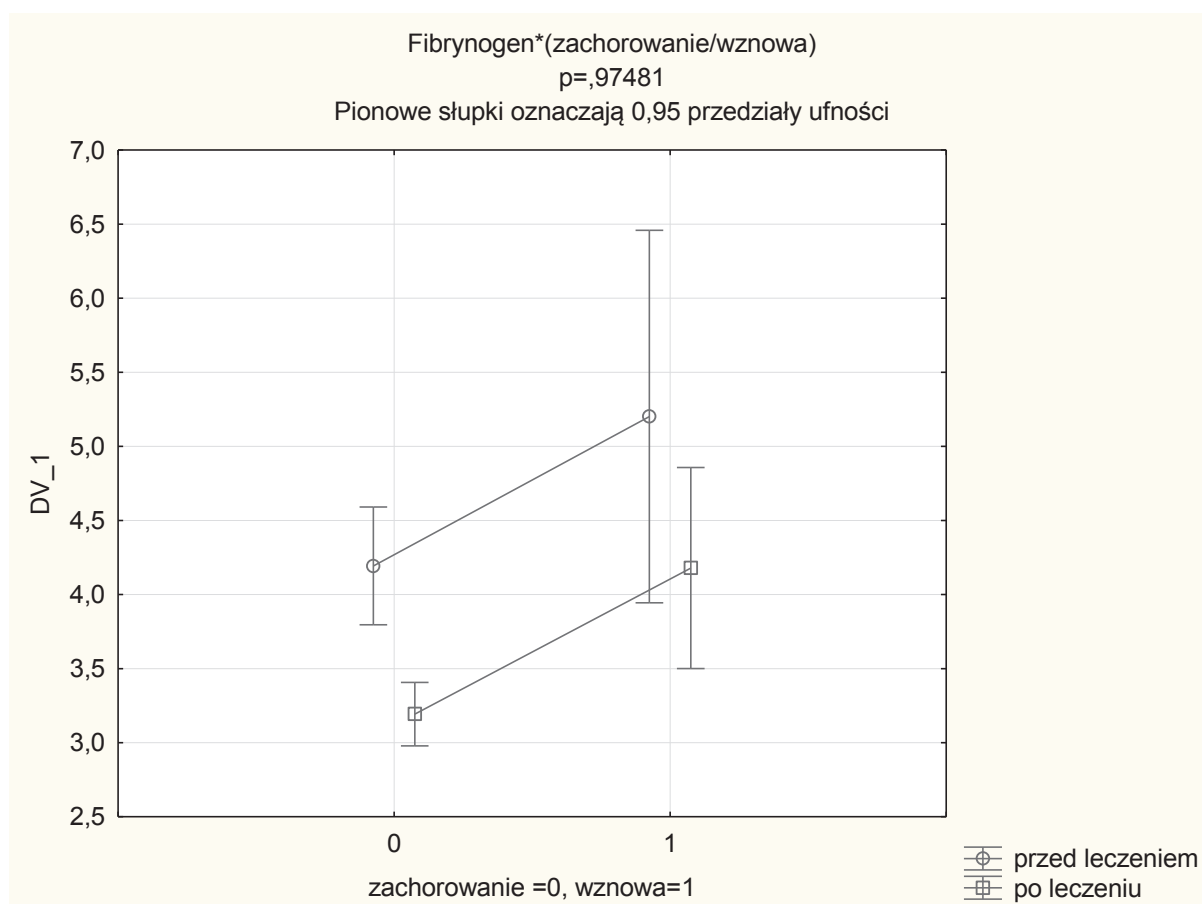
nowotworowej, niż u chorych ze wznową choroby, różnica była znamienna statystycznie ($p=0,033$).

2. Wskaźnik protrombinowy

Wartość wskaźnika protrombinowego oznaczono w grupie 73 chorych z pierwotnym rozpoznaniem nowotworu. Wyjściowe wartości wahały się w przedziale od 78% do 109% (średnia 95,6%), zaś po leczeniu wynosiły one: minimalna 83%, a maksymalna 112% (średnia 97,48%). Wartości wskaźnika protrombinowego u ośmiu chorych ze wznową choroby nowotworowej przed leczeniem, kształtowały się w granicach: 86% - 110% (średnia 97,875%), zaś po leczeniu wznowy wskaźnik protrombinowy wynosił od 79% do 104% (średnia 94,25%), różnice nie były znamienne statystycznie. W obu grupach nie stwierdzono również znamiennych różnic wartości wskaźnika protrombinowego przed i po leczeniu onkologicznym ($p=0,59$). **Stwierdzono odmienne zachowanie się wskaźnika przed i po leczeniu u chorych z pierwotnym rozpoznaniem i wznową. W trakcie leczenia pierwotnego zachorowania wskaźnik protrombinowy wzrastał, zaś malał w grupie chorych ze wznową nowotworu. Ta różnica była bliska znamienności statystycznej ($p=0,0993$).**

3. Fibrynogen

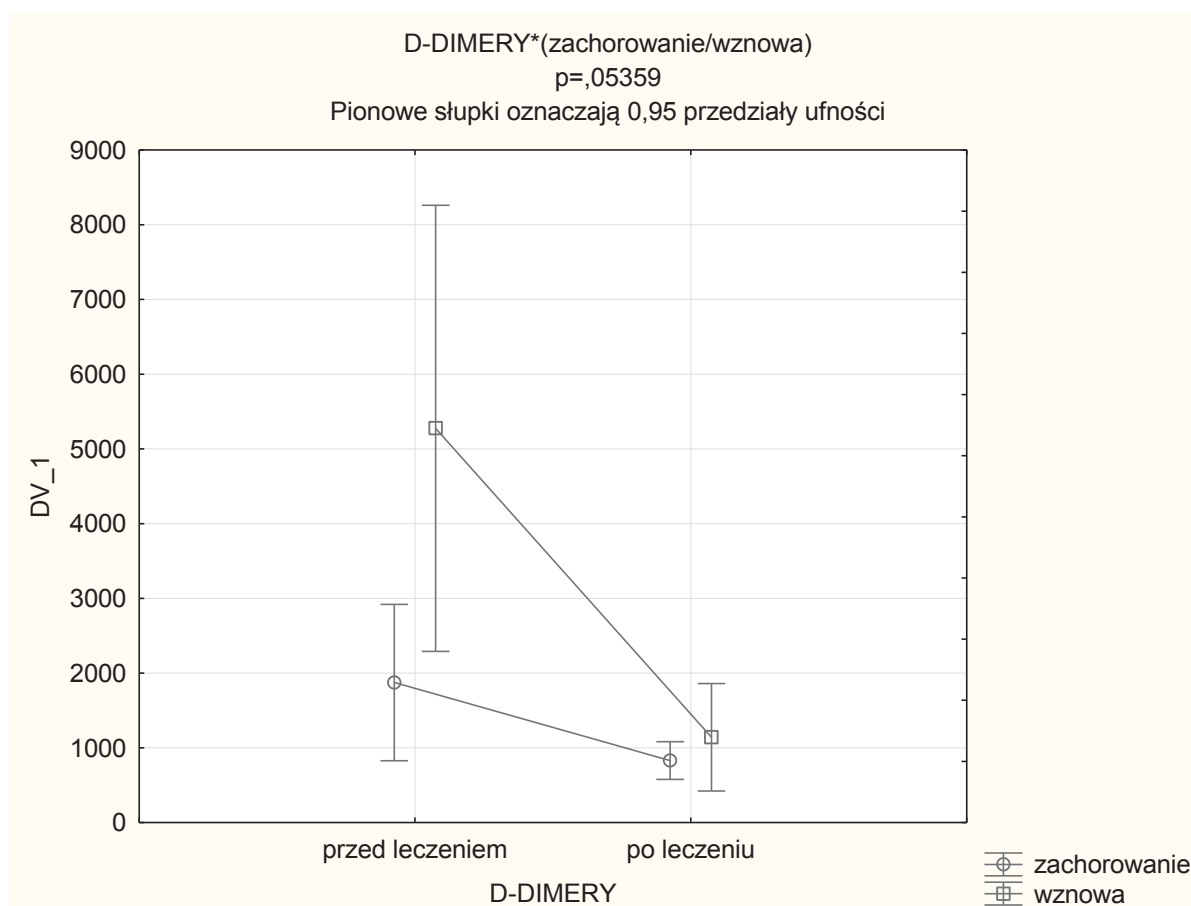
U chorych (70 dzieci) w momencie diagnozy pierwotnego zachorowania na nowotwór, stężenia fibrynogenu kształtowały się w granicach: 0,98 – 8,79g/l (średnia 4,207g/l). Stężenia fibrynogenu u siedmiu pacjentów ze wznową, wahały się w przedziale od 2,4 do 7,3g/l (średnia 5,201g/l). Po zakończeniu leczenia pierwotnej choroby nowotworowej, stężenie fibrynogenu wynosiło od 1,51 do 6,08g/l (średnia 3,193g/l). Po leczeniu onkologicznym wznowy nowotworu, stężenia fibrynogenu mieściły się w granicach od 3,18 do 5,97g/l (średnia 4,178g/l). W grupie pierwotnego zachorowania, po leczeniu onkologicznym średnie stężenie fibrynogenu obniżyło się do wartości prawidłowych. Stwierdzono natomiast podwyższone średnie stężenie fibrynogenu powyżej granicy normy, po leczeniu wznowy. **Wyjściowe średnie wartości fibrynogenu we wznowie choroby nowotworowej przed leczeniem onkologicznym, były znamienne wyższe, niż w przypadku pierwotnego rozpoznania nowotworu ($p=0,013$). Po terapii przeciwnowotworowej u chorych zarówno z pierwotnym rozpoznaniem, jak i we wznowie, wartości średnie stężeń fibrynogenu obniżały się znamienne ($p<0,01$).**



Wykres 11: Wartości stężenia fibrynogenu przed i po leczeniu w pierwotnym zachorowaniu i wznowie.

4. D-dimer

Stężenia D-dimeru w grupie chorych (57osób) z pierwotnym rozpoznaniem nowotworu, wyjściowo wynosiły od 113 do 15410 ug/l (średnia 1873 ug/l). W chwili wznowy nowotworu stężenia D-dimeru kształtowały się w zakresie od 191 do 25 681 ug/l, średnia wartość wyniosła 5275 ug/l. Po zakończonym leczeniu przeciwnowotworowym w grupie z pierwotną chorobą nowotworową stwierdzono stężenia D-dimeru od 71 do 4390 ug/l, średnia wartość 830ug/l. Po zakończonym leczeniu wznowy wartości D-dimeru wahały się w granicach od 370 do 3825 ug/l, średnia wartość wyniosła 1141 ug/l.



Wykres 12: Wartości stężeń D-dimeru przed i po leczeniu w pierwotnym zachorowaniu i wznowie choroby nowotworowej.

Stwierdzono znamienne wyższe średnie stężenia D-dimeru w momencie diagnozy w grupie pacjentów ze wznową choroby nowotworowej ($p=0,03$). Obniżenie stężenia D-dimeru po leczeniu onkologicznym stwierdzono w obu grupach chorych ($p<0,01$). Zaobserwowano, że po terapii przeciwnowotworowej wznowy nowotworu, obniżenie wartości stężenia D-dimeru było większe, niż po leczeniu pierwotnego zachorowania i różnica między obu grupami pozostawała na granicy znamienności statystycznej ($p=0,053$).

W odniesieniu do pozostałych parametrów układu krzepnięcia: międzynarodowy współczynnik znormalizowany - INR, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), antytrombina III, nie stwierdzono różnic statystycznie znamiennych w grupach z pierwotnym zachorowaniem i wznową. Ponadto w obu porównywanych grupach nie stwierdzono różnic w wartościach tych parametrów badanych przed i po terapii.

C. Analiza parametrów krzepnięcia u dzieci w zależności od stadium choroby.

W badanej grupie, znalazło się 27 chorych (32%) w stadium uogólnionym choroby oraz 51 dzieci (59%) z chorobą zlokalizowaną. Przeanalizowano podstawowe parametry hemostazy przed i po leczeniu w zależności od stadium choroby zasadniczej.

1. Płytki krwi

Liczba płytek krwi w grupie chorych ze zlokalizowaną chorobą nowotworową wynosiła od 119 do 607 tys./ul (średnio 338 tys./ul). Tylko jeden wynik był niższy od normy (u chorego z guzem Wilms'a). U 11 chorych liczba płytek krwi przekraczała górną granicę normy (czworo chorych z chłoniakiem Hodgkina, troje ze zwojakiem zarodkowym, dwoje z mięsakiem tkanek miękkich oraz po jednym z guzem germinalnym i guzem Wilms'a).

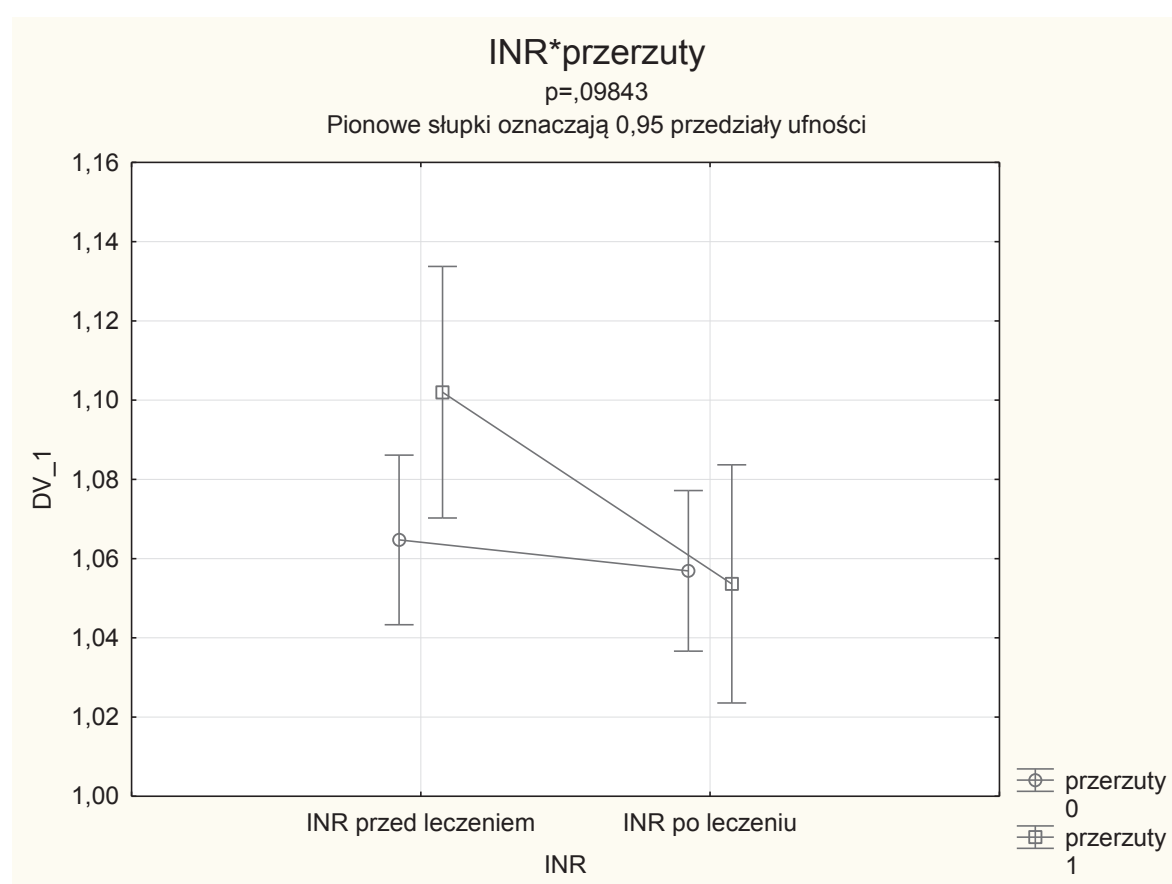
W grupie chorych w stadium rozsiały choroby nowotworowej wartość płytek krwi wahała się w granicach od 25 do 947 tys./ul. Średnia w tej grupie wyniosła 417,322 tys./ul i przekroczyła ustaloną normę. Obniżoną liczbę płytek do 25 tys./ul stwierdzono u jednej chorej z mięsakiem tkanek miękkich i przerzutami do szpiku kostnego. Wśród chorych w IV stopniu zaawansowania było 13 dzieci z wynikami przekraczającymi normę i byli to głównie pacjenci z przerzutami: do płuc (7 chorych) i wątroby (3 chorych). **Wykazano znamienne wyższą średnią liczbę płytek krwi u chorych z uogólnioną postacią choroby nowotworowej ($p=0,039$).**

2. Wskaźnik protrombinowy

Wartości wskaźnika protrombinowego wyjściowo w grupie chorych bez przerzutów nowotworowych (50 chorych) wahały się od 78 do 112%, średnia 96,42%. Po przeprowadzonym leczeniu w tej grupie wynosiły od 83 do 112%, a średnia 97,82%. U 25 chorych z chorobą rozsiałą, wartości wskaźnika protrombinowego w chwili diagnozy zawierały się w przedziale od 82 do 108%, średnia 94,12%. Po leczeniu onkologicznym poziomy wskaźnika protrombinowego kształtowały się w zakresie 84 - 107%, a średnia 97,2%. Wstępne różnice wartości tego parametru pomiędzy grupami chorych nie były istotne. Po zakończonej terapii, średnie wartości wskaźnika protrombinowego w obu grupach były wyższe i porównywalne ze sobą (97,82% i 97,2%). Wykazany **wzrost wartości wskaźnika protrombinowego w obu grupach chorych po zakończeniu terapii nowotworu był na granicy istotności statystycznej ($p=0,091$).**

3. INR

W grupie dzieci z miejscowo zaawansowaną chorobą nowotworową (50 dzieci) wartość INR przed leczeniem zawierały się między 0,91 a 1,34 (średnia 1,0662), a po zakończeniu leczenia między 0,93 a 1,25 (średnia 1,054). Analizując wartości INR w grupie chorych z rozsiałą chorobą nowotworową uzyskano 25 wyników. Wartości INR w chwili diagnozy w tej grupie wahały się od 0,97 do 1,27 (średnia 1,102). Po leczeniu minimalna wartość INR wynosiła 0,94, a maksymalna 1,24 (średnia 1,0536). Wartości INR w grupie chorych w IV stopniu zaawansowania były wyjściowo wyższe, niż w grupie bez przerzutów. Wartości końcowe INR, po leczeniu były porównywalne w obu grupach.

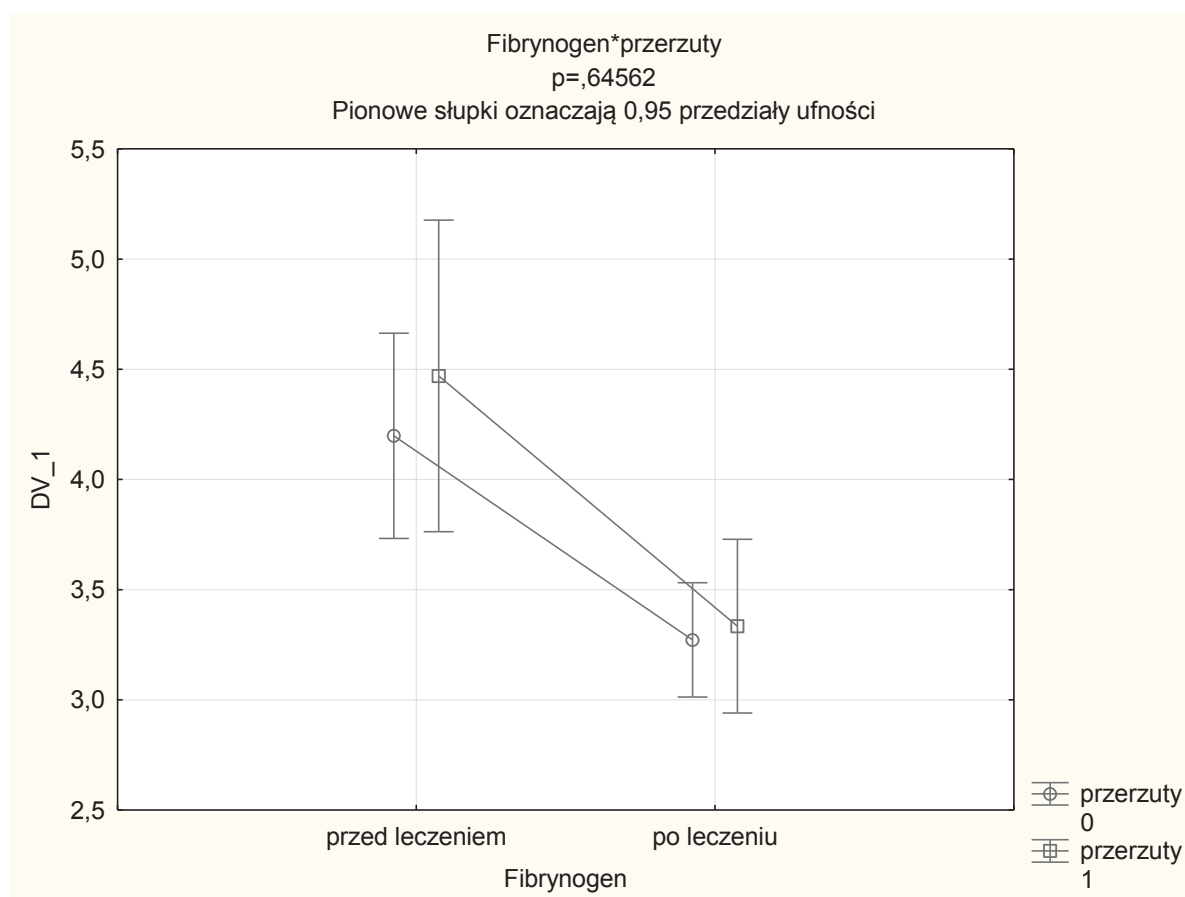


Wykres 13. Wartości INR w zależności od zaawansowania choroby nowotworowej i leczenia

Różnice wartości INR w momencie rozpoznania w chorobie zlokalizowanej i uogólnionej były statystycznie istotne ($p=0,023$). Obniżenie wartości INR po zastosowaniu terapii onkologicznej było istotnie większe w grupie chorych z przerzutami, niż bez przerzutów ($p=0,098$).

4. Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu oznaczone w grupie 50 dzieci ze zlokalizowaną chorobą nowotworową wahało się w zakresie wartości od 2,17 do 8,33g/l (średnia 4,206g/l). Wśród 23 dzieci z przerzutową postacią choroby nowotworowej, w badaniach wyjściowych stwierdzono wartości fibrynogenu wynoszące od 0,98 do 8,79g/l (średnia 4,47g/l). Po przeprowadzonym leczeniu przeciwnowotworowym u chorych z chorobą zlokalizowaną, wartości fibrynogenu były niższe: 1,51 – 5,97g/l (średnia 3,26g/l). W grupie chorych z chorobą rozsianą, również stwierdzono obniżenie stężenia fibrynogenu i wynosił on od 1,8 do 6,08g/l (średnia 3,334g/l). Stężenia fibrynogenu w obu grupach przed leczeniem przekraczały górną granicę normy, a po leczeniu mieściły się w granicach ustalonej normy.



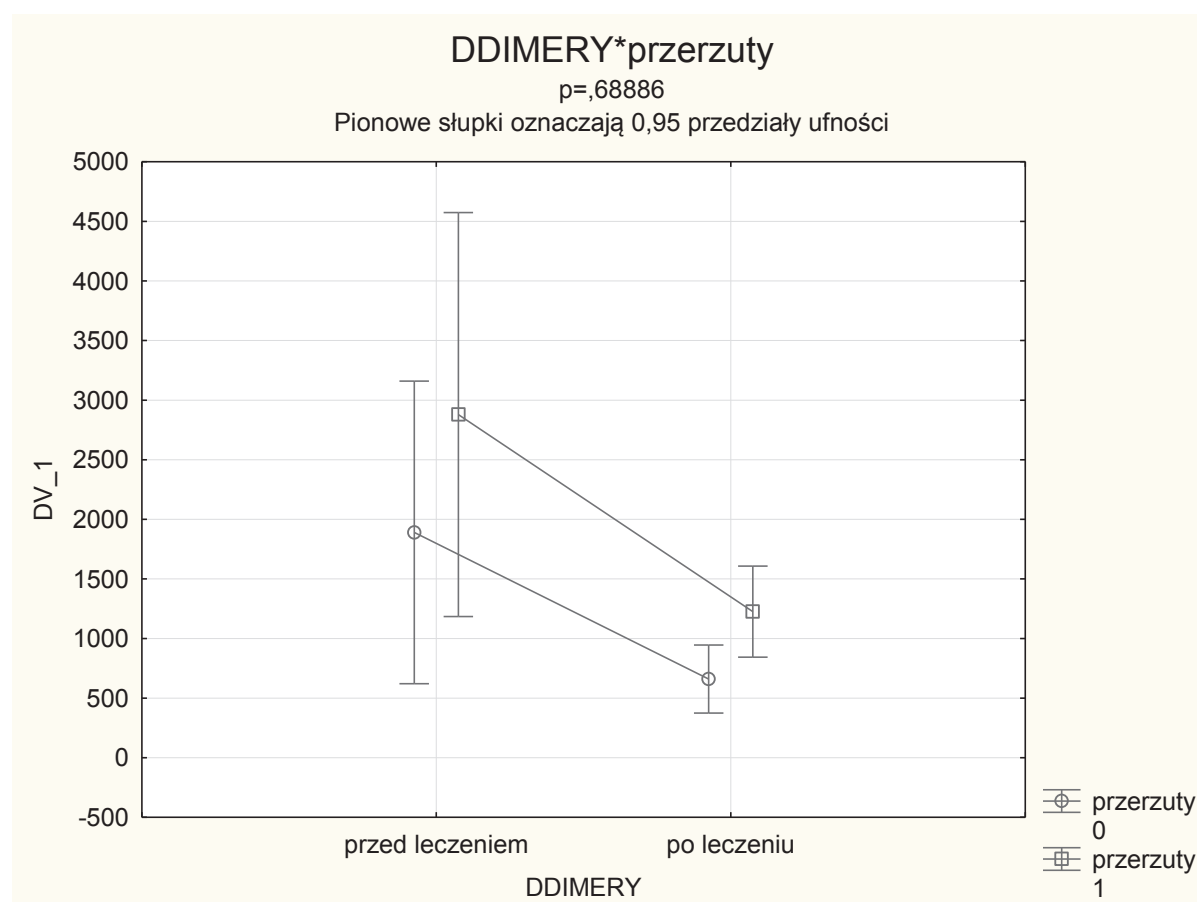
Wykres 14. Zmiany wartości fibrynogenu pod wpływem leczenia onkologicznego u chorych w różnych stadiach zaawansowania choroby nowotworowej.

Średnie wartości fibrynogenu w momencie diagnozy nowotworu u dzieci niezależnie od stadium zaawansowania nowotworu, były porównywalne (4,2 g/l vs 4,47g/l). Po leczeniu średnie wartości stężenia fibrynogenu również były w obu grupach zbliżone i wynosiły 3,3g/l. Nie wykazano związku między średnią wartością stężenia fibrynogenu, a stadium

zaawansowania choroby ($p=0,52$). Na podstawie oceny statystycznej potwierdzono **znamiennie obniżenie stężenia fibrynogenu po zastosowaniu terapii przeciwnowotworowej, niezależnie od stadium zaawansowania choroby ($p<0001$)**.

5. D-dimer

Oceniono stężenie D-dimeru w momencie diagnozy w grupie 41 dzieci z rozpoznaniem zlokalizowanej postaci choroby nowotworowej. Wahały się one w zakresie od 113 do 25681 ug/l (średnio 1890 ug/l). W rozsianej postaci choroby nowotworowej stężenie D-dimeru oznaczono u 23 pacjentów. Wyjściowo jego wartości kształtowały się od 140 do 15410 ug/l (średnio 2879 ug/l). Po leczeniu onkologicznym w grupie ze zlokalizowaną chorobą stwierdzono stężenia D-dimeru od 170 do 4390 ug/l (średnia 660ug/l). W przypadku chorych w IV stadium po leczeniu onkologicznym stężenie D-dimeru wahało się od 71 do 3825ug/l (średnio 1225ug/l). Średnie wartości, niezależnie od zaawansowania choroby i efektu terapii, przekraczały zakres normy.



Wykres 15. Wartości stężenia D-dimeru przed i po leczeniu onkologicznym w zależności od zaawansowania choroby nowotworowej.

Na podstawie danych i analizy statystycznej oceniono, że średnie wartości D-dimeru były wyższe w czwartym stadium choroby nowotworowej, zarówno przed jak i po leczeniu onkologicznym, lecz różnica nie była istotna statystycznie ($p=0,17$). **Wykazano istotne obniżenie średniej wartości D-dimeru po leczeniu przeciwnowotworowym ($p=0,007$), w obu grupach, niezależnie od stadium choroby nowotworowej.**

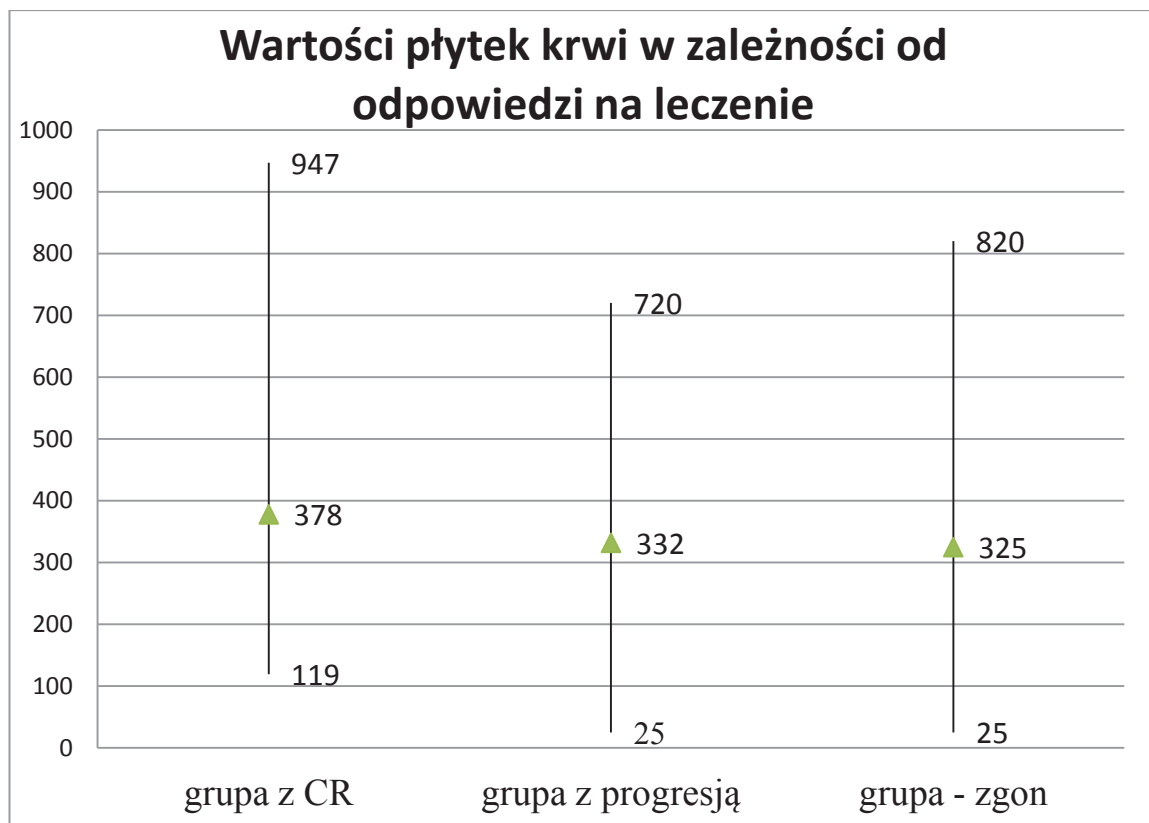
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wartości APTT i AT III przed i po leczeniu onkologicznym chorych z miejscowo zaawansowaną chorobą nowotworową i z chorobą w czwartym stopniu zaawansowania.

D. Parametry krzepnięcia w surowicy krwi w zależności od uzyskanej odpowiedzi na leczenie onkologiczne.

Kliniczną obserwację chorych od momentu włączenia do badania prowadzono w czasie od marca 2008r do grudnia 2014r. W tym okresie u 57 chorych (66%) uzyskano całkowitą remisję, która utrzymywała się do końca obserwacji, a u 29 dzieci (34%) rozpoznano progresję choroby nowotworowej, spośród których 23 dzieci (27%) zmarło w konsekwencji niepomyślnego przebiegu choroby. Przeprowadzono analizę parametrów układu krzepnięcia w zależności od wyników leczenia. U chorych z rozpoznaną progresją choroby kontrolne badania krwi pobierano w momencie stwierdzenia progresji. W analizie chorych, którzy zmarli wykorzystywano badania pobrane w chwili rozpoznania progresji

1. Płytki krwi

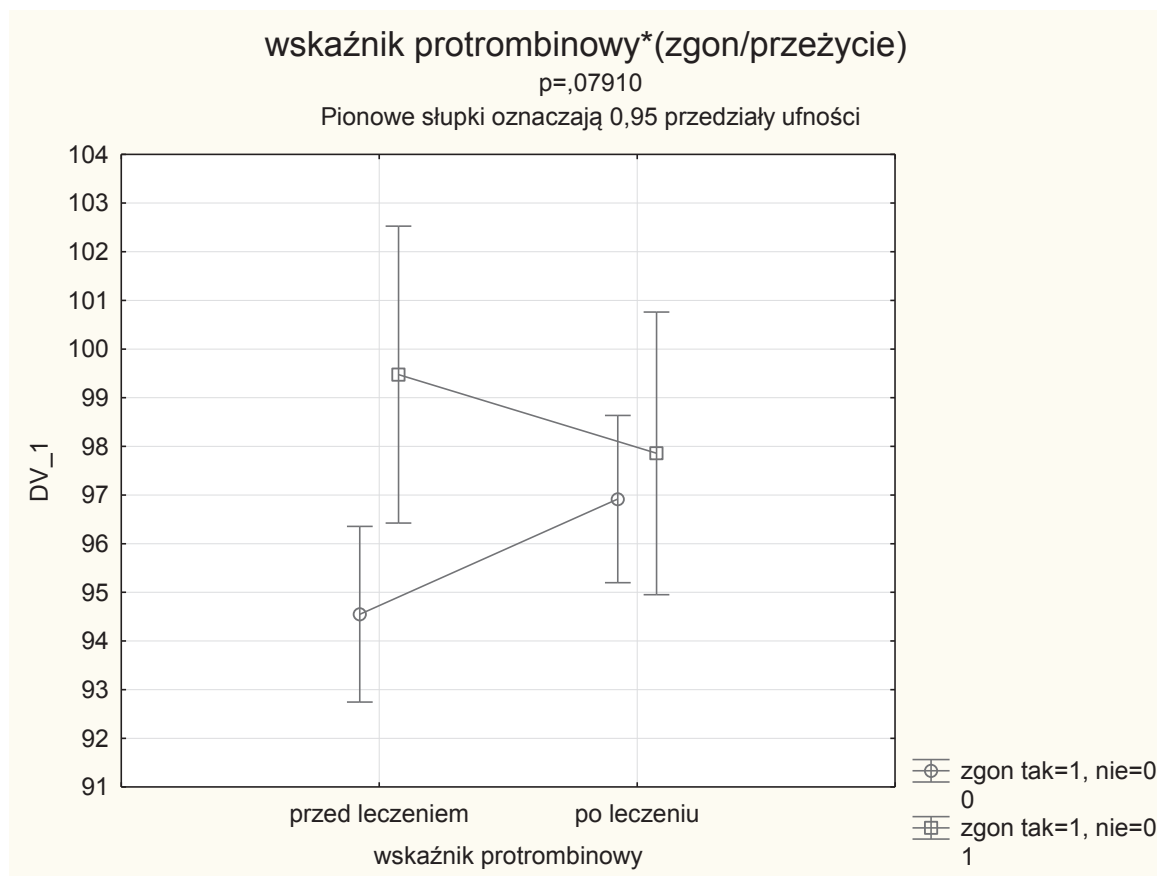
Liczba płytek krwi w chwili diagnozy, u dzieci u których uzyskano utrzymującą się całkowitą remisję choroby nowotworowej, wahała się od 119 do 947 tys./ μ l, średnio 378,067 tys./ μ l. Zaś w grupie, w której doszło do progresji nowotworu, wynosiła od 25 do 720 tys./ μ l, średnia 332,701 tys./ μ l. W grupie 23 chorych, którzy zmarli z powodu nowotworu, wartości płytek krwi wahały się od 25 do 820 tys./ μ l, średnia 325,217 tys./ μ l. **Średnia liczba płytek krwi, w grupie o niepomyślnym przebiegu leczenia, w chwili diagnozy nowotworu była niższa, niż u chorych u których nie doszło do progresji nowotworu. Wykazano statystycznie znamiennej różnicę średnich wartości płytek krwi między tymi grupami chorych ($p=0,026$).**



Wykres 16. Wartości płytek krwi w zależności od odpowiedzi na leczenie.

2. Wskaźnik protrombinowy

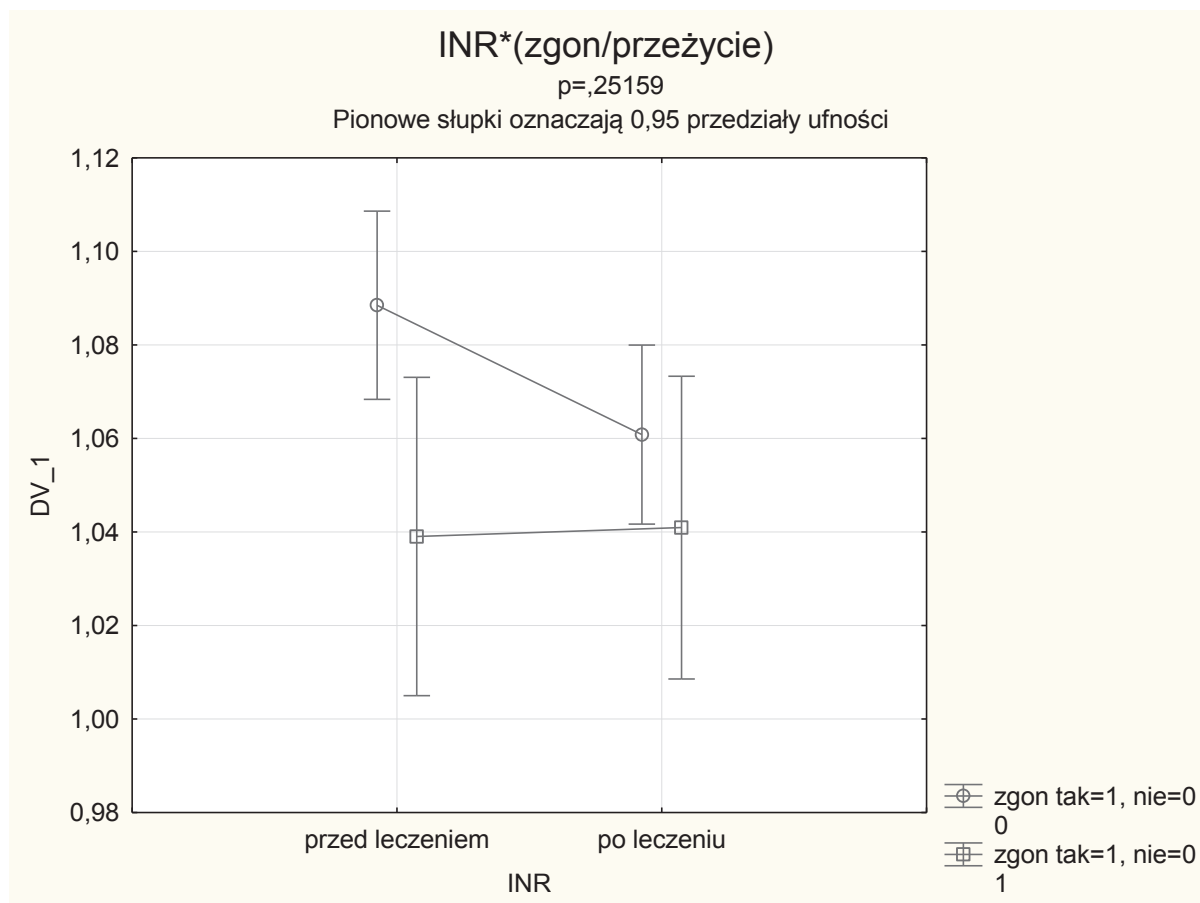
W grupie, która osiągnęła pozytywną odpowiedź na terapię (57 chorych), rozpiętość wyników przed leczeniem kształtowała się w przedziale od 78 do 109%, a średnia wyniosła 94,55%. Po leczeniu wartości wskaźnika protrombinowego były wyższe i wynosiły od 83% do 112%, ze średnią 96,917%. W grupie chorych, u których wystąpiła progresja choroby i w dalszej obserwacji zgon (21 chorych), wstępnie w momencie diagnozy nowotworu wartości wskaźnika wahały się od 82 do 110%, średnia wyniosła 99,476%. W chwili rozpoznania progresji choroby stwierdzano niższe wartości wskaźnika protrombinowego, które wynosiły od 79 do 111%, a średnia 97,857%. **Średnia wartość wskaźnika protrombinowego w grupie o niepomyślnym przebiegu leczenia, była znacząco niższa w momencie stwierdzania progresji, w porównaniu do wartości oznaczanej w momencie diagnozy nowotworu ($p < 0,05$).** Stwierdzono istnienie statystycznie znaczącej różnicy w średnich wartościach wskaźnika protrombinowego pomiędzy grupą dobrze odpowiadającą na leczenie, a grupą zmarłych z progresji ($p = 0,03$). Zaobserwowano tendencję do obniżania się średniej wartości wskaźnika protrombinowego w grupie chorych w momencie progresji, a w grupie z pozytywną odpowiedzią na leczenie ulegał wzrostowi ($p = 0,079$).



Wykres 17. Wartości wskaźnika protrombinowego przed i po leczeniu w zależności od przeżycia.

3. INR

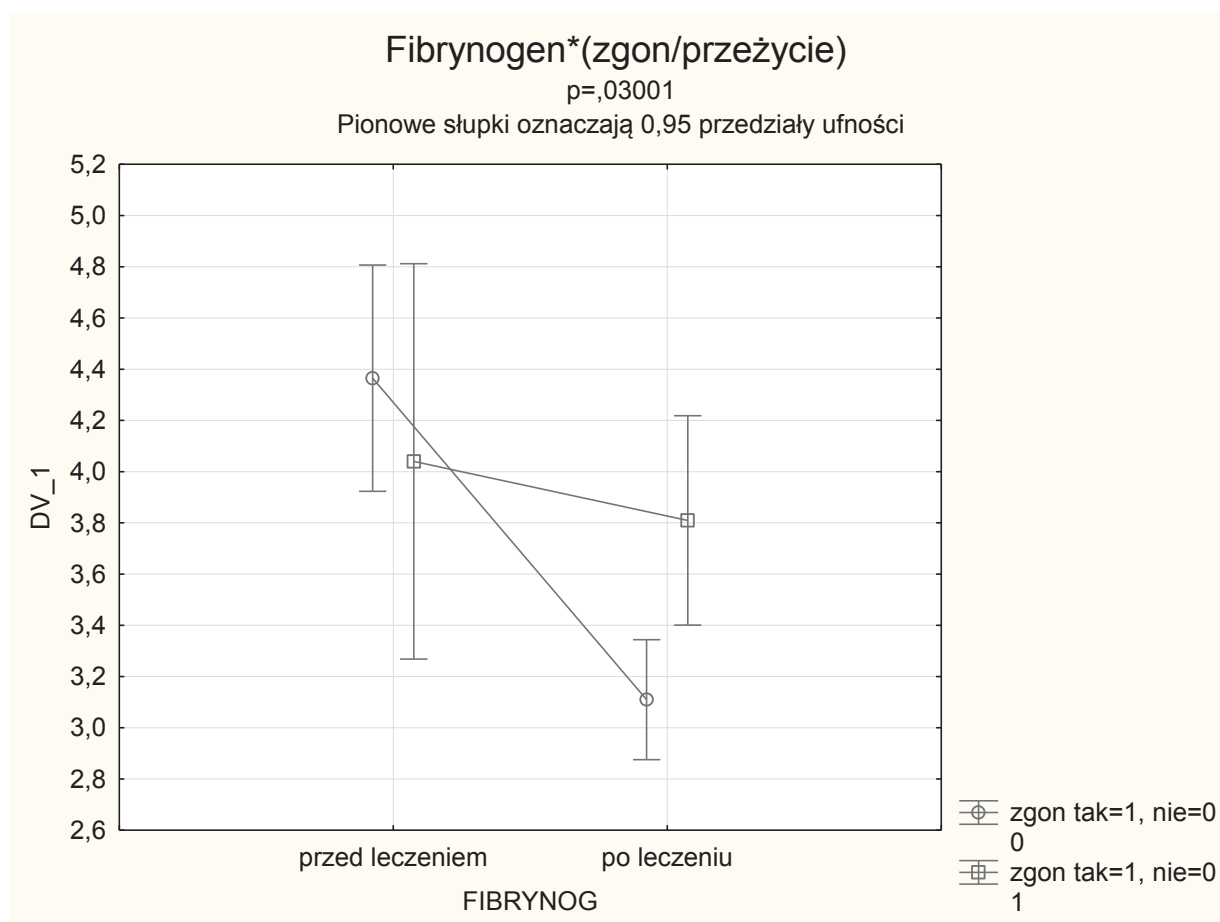
W grupie z dobrą odpowiedzią na leczenie (57 dzieci) rozpiętość wyników przed leczeniem kształtowała się w przedziale od 0,91 do 1,34, a średnia wyniosła 1,0885. Po leczeniu stwierdzono wartości INR od 0,93 do 1,25, średnia 1,0608. INR oceniono w grupie 21 dzieci o niepomyślnym przebiegu choroby. Wyjściowo wartości INR wahały się w zakresie od 0,97 do 1,27, średnio 1,039. Po leczeniu parametry te wynosiły od 0,94 do 1,27, średnia 1,041. Nie stwierdzono znamiennych różnic średniej wartości INR w obu grupach po leczeniu. **Wykazano, że średnia wartość INR w chwili diagnozy w grupie dzieci z niepomyślnym przebiegiem choroby była znamienne niższa, niż w grupie która osiągnęła całkowitą remisję ($0=0,019$).** W momencie progresji średnia wartość INR była porównywalna z wartością INR w momencie diagnozy, zaś w grupie wyleczonych obniżyła się.



Wykres 18. Wartości INR przed i po leczeniu w zależności od odpowiedzi na leczenie.

4. Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu w surowicy oznaczono w grupie 57 dzieci, które osiągnęły całkowitą remisję, a w grupie chorych, u których stwierdzono niepomyślny przebieg choroby, analizie poddano 19 osób. W grupie, która osiągnęła całkowitą remisję, wartości wyjściowe stężenia fibrynogenu wahały się od 2,17 do 8,79g/l, średnio 4,3648g/l. W grupie z progresją choroby, wartości stężenia fibrynogenu na początku obserwacji wykazywały rozpiętość od 0,98 do 7,3g/l, średnio 4,04g/l. Średnie stężenia fibrynogenu przed leczeniem w obu grupach były wysokie i przekraczały granice normy - nie stwierdzono między nimi różnicy statystycznej. Po zakończonym leczeniu w grupie z dobrą odpowiedzią, stężenie fibrynogenu mieściło się w zakresie od 1,8 do 6,08g/l, średnio 3,1098g/l. W badaniu grupy o niepomyślnym przebiegu, w chwili progresji stężenie fibrynogenu wahało się od 1,51 do 5,97g/l, ze średnią wartością 3,809g/l.



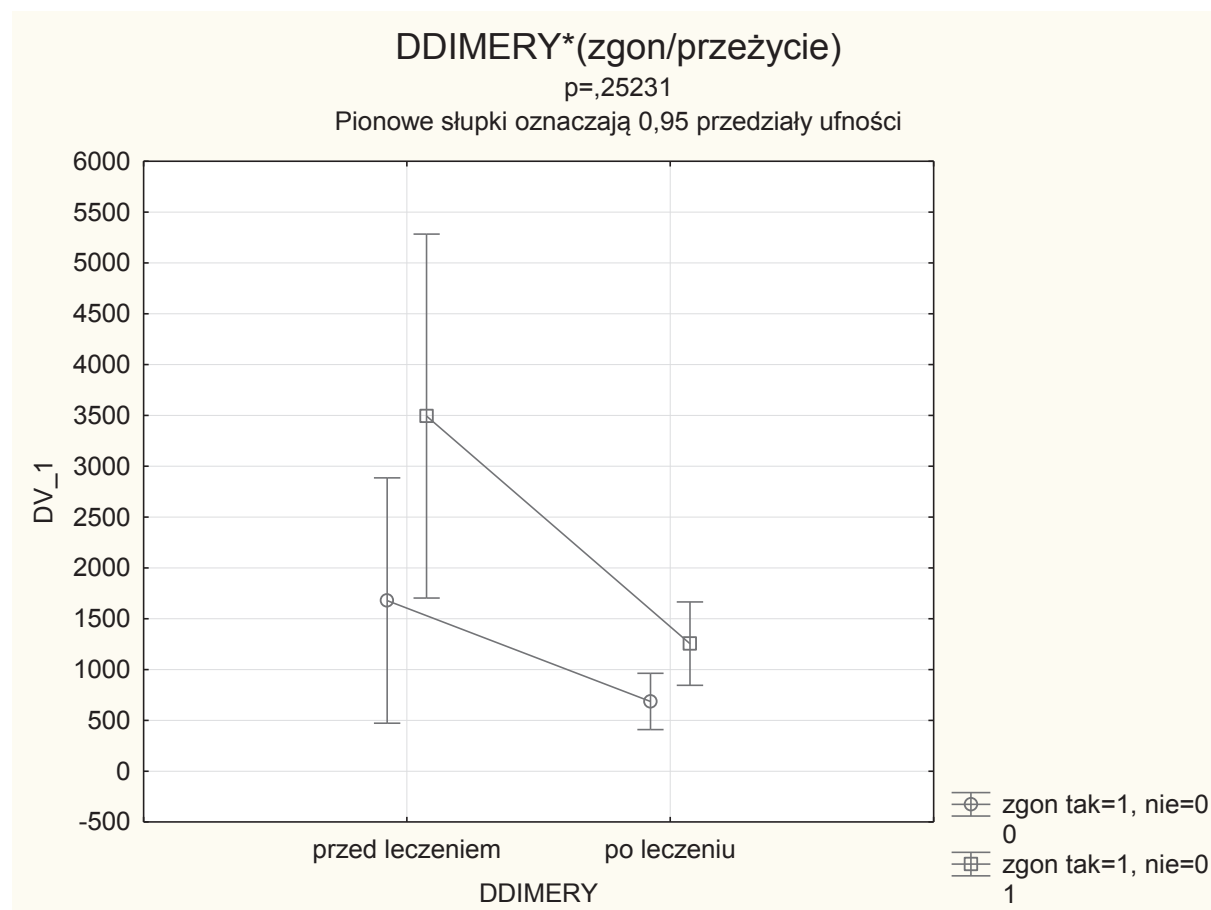
Wykres 19. Ocena wartości stężenia fibrynogenu przed i po leczeniu onkologicznym w zależności od odpowiedzi na leczenie .

Na podstawie analizy statystycznej **wykazano** **znamiennie obniżenie średniego stężenia fibrynogenu po zastosowanym leczeniu w porównaniu ze średnimi wartościami na początku obserwacji, zarówno w grupie która osiągnęła całkowitą remisję, jak i w grupie o niepomyślnym przebiegu choroby ($p=0,0019$).** Średnie stężenie fibrynogenu po leczeniu onkologicznym było **znamiennie wyższe ($p=0,03$) u chorych z niepomyślną odpowiedzią, niż w grupie która pozostała w całkowitej remisji.**

5. D-dimer

Stężenia D-dimeru w surowicy krwi oceniono w grupie 20 chorych z niepomyślnym przebiegiem choroby i grupie 44 dzieci z dobrą odpowiedzią na leczenie. W obu grupach w momencie diagnozy, wartości stężeń D-dimeru wahały się w szerokim zakresie. W grupie dzieci z pozytywną odpowiedzią na leczenie wartość stężenia D-dimeru w momencie diagnozy wyniosła od 126 do 9056 ug/l, średnia 1678,41 ug/l, a po leczeniu stężenie D-dimeru wynosiło od 71 do 3100 ug/l, średnio 685,75ug/l. W grupie z progresją choroby

wartości stężeń D-dimeru wahały się w zakresie od 113 do 25681 ug/l, a średnia wyniosła 3493,9 ug/l, zaś po leczeniu onkologicznym stężenia wynosiły od 258 do 4390 ug/l, średnia 1254,9 ug/l. W obu grupach, zarówno przed jak i po leczeniu średnie wartości D-dimeru przekraczały zakres normy (N: <500 ug/l).



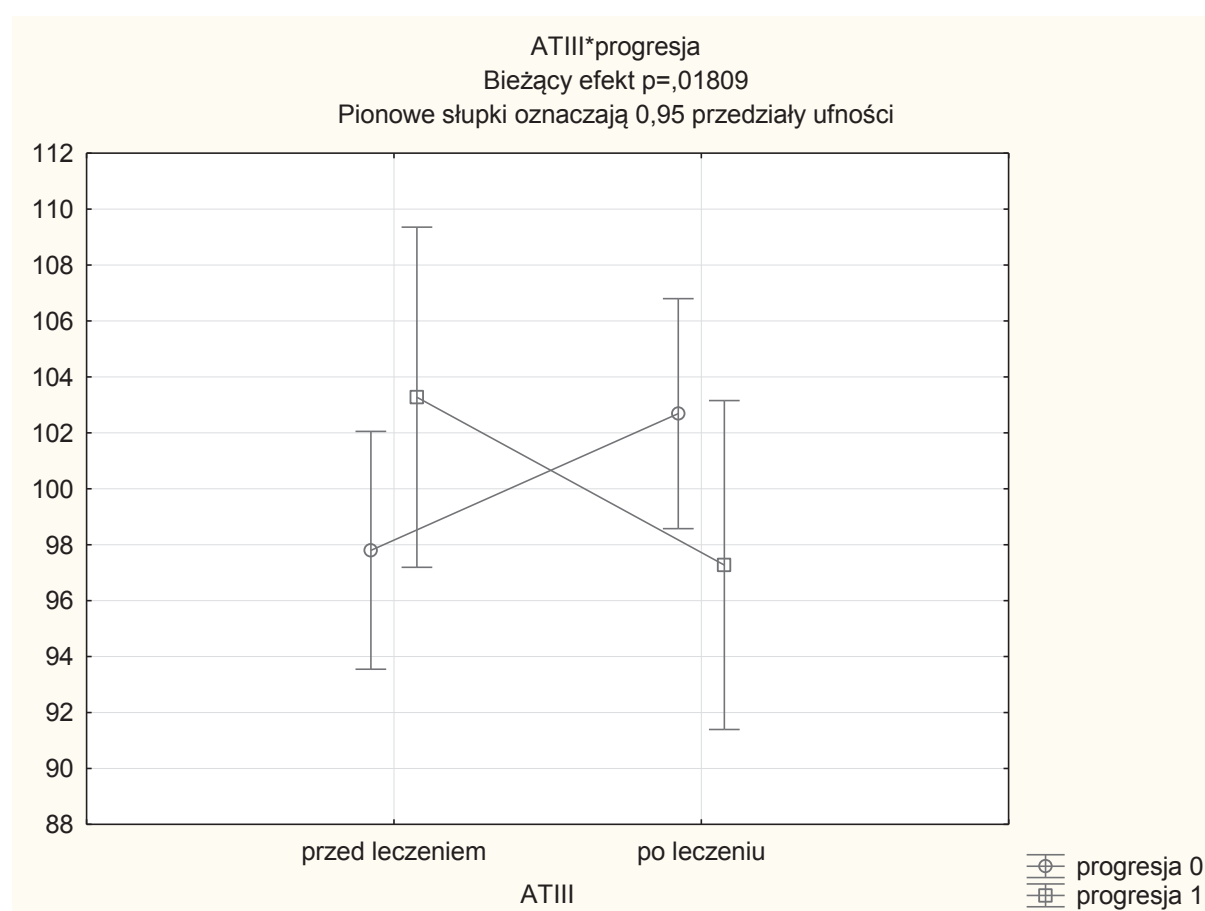
Wykres 20. Stężenie D-dimerów w surowicy przed i po włączeniu leczenia onkologicznego w zależności od odpowiedzi na to leczenie.

Uzyskane wyniki wskazują, że u chorych z niepomyślnym przebiegiem choroby średnie stężenie D-dimeru w momencie diagnozy było znamienne wyższe w porównaniu z grupą chorych z dobrą odpowiedzią na leczenie (CR) ($p=0,04$). Po zastosowaniu leczenia onkologicznego stwierdzono w obu grupach istotne obniżenie średniego stężenia D-dimerów, chociaż nie osiągnęło ono wartości prawidłowych ($p<0,01$).

6. Antytrombina III (AT III)

Stężenie antytrombiny III oceniono w grupie 45 chorych z dobrą odpowiedzią i u 22 z niepomyślnym przebiegiem choroby. W przypadku pozytywnej odpowiedzi, wstępne wyniki stężeń AT III wahały się od 62 do 126%, a średnia wyniosła 97,8% i mieściła się w zakresie normy. Po leczeniu w tej grupie, wartości stężeń AT III wynosiły od 76 do 125%, średnia

102,68%, również mieściła się w obowiązującej normie. Stężenie antytrombiny III w grupie chorych, u których wystąpiła progresja, w chwili diagnozy wynosiło od 53 do 123%, średnia 103,27%. W badaniach kontrolnych po zastosowaniu leczenia poziom wahał się od 65 do 123%, średnia 97,27%. Różnice były statystycznie nieznaczne. **Analiza statystyczna wykazała natomiast zmianę wartości stężeń AT III w obu porównywanych grupach po zastosowaniu leczenia onkologicznego ($p=0,018$). W grupie o niepomyślnym przebiegu stężenie AT III obniżyło się, a w grupie dobrze odpowiadającej na leczenie AT III wzrosło.**



Wykres 21. Wartości stężeń AT III przed i po leczeniu w zależności od wystąpienia progresji choroby nowotworowej.

W odniesieniu do czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupą chorych z progresją i grupą pacjentów dobrze odpowiadających na leczenie.

III. Stężenie czynnika tkankowego (TF) w surowicy krwi.

1. Stężenia TF w surowicy przed i po leczeniu onkologicznym.

Wykonano oznaczenia TF w surowicy krwi u 55 badanych dzieci. Przed leczeniem onkologicznym stężenie czynnika tkankowego wynosiło od 0,4 do 133,3 pg/ml, średnia 55,606 pg/ml. Po leczeniu onkologicznym stwierdzono wyższą średnią wartość TF - 61,974 pg/ml, a zakres stężeń wahał się od 0 do 262,44 pg/ml. Nie stwierdzono znamiennej różnicy w średniej wartości stężeń TF przed i po leczeniu onkologicznym ($p=0,3$) – tabela 15.

Tabela 15. Stężenie czynnika tkankowego (TF) przed i po leczeniu onkologicznym.

	Punkt czasowy	Liczba oznaczeń	Średnia	Odchylenie standardowe	P
Czynnik tkankowy TF	przed leczeniem		55,60602	28,48888	0,296833
Czynnik tkankowy TF	po leczeniu	55	61,97418	43,56942	

2. Stężenie TF w surowicy krwi w zależności od rozpoznania histopatologicznego.

Analizę stężeń TF w surowicy krwi przeprowadzono w czterech wyznaczonych według rozpoznań histologicznych podgrupach chorych. Wyniki przedstawiono w tabeli 16.

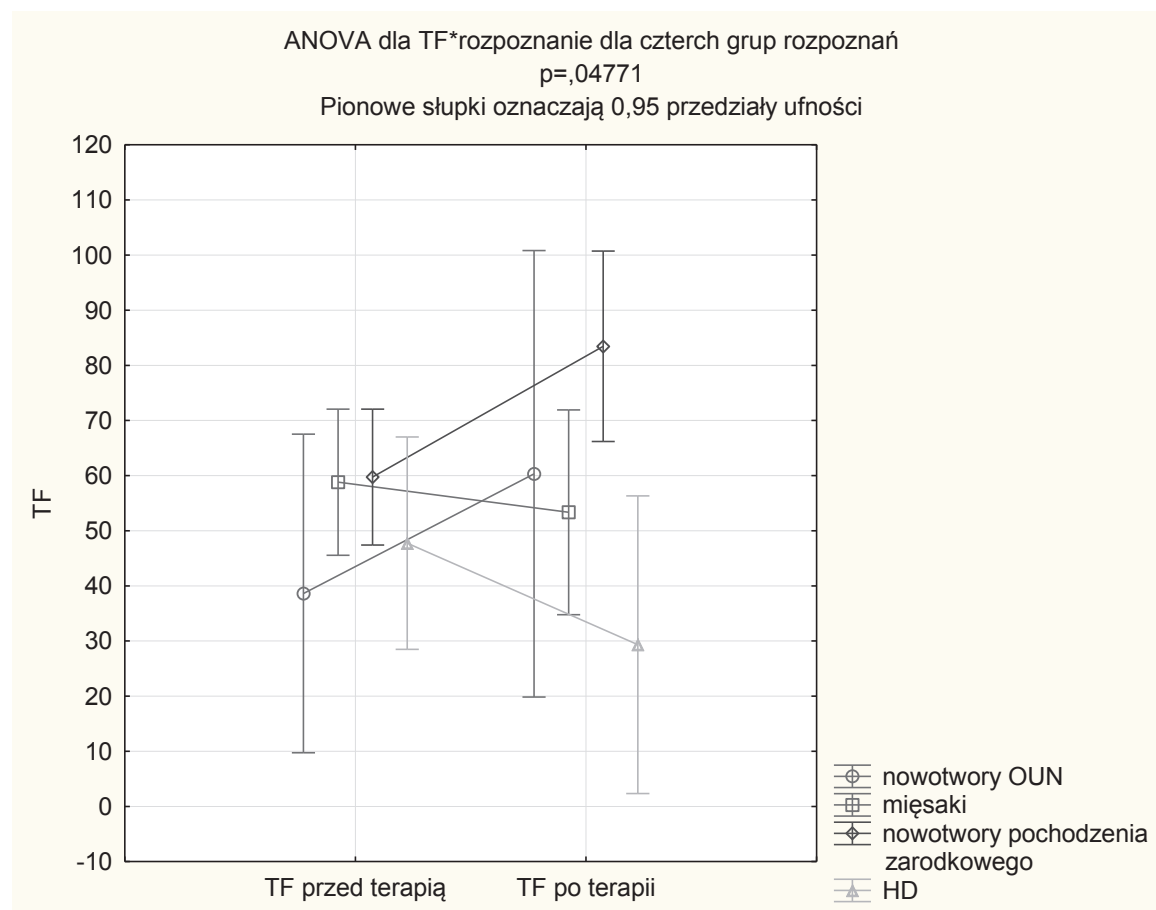
Tabela 16. Stężenie TF w zależności od rozpoznania histopatologicznego (4 podgrupy).

Etap choroby	Wartości badane	Czynnik tkankowy (pg/ml) w podgrupie			
		Nowotwory OUN	Mięsaki i guzy kości	Guzy zarodkowe	Chłoniak Hodgkina
Przed Leczeniem	Min	16,49	14,243	28,9	0,4
	Średnie	38,6225	58,8111	58,9826	47,7589
	Max	69,49	133,3	118,54	110,54
Po Leczeniu	Min	23,83	0	32,28	5,98
	Średnie	60,3275	53,35	82,1574	29,3334
	Max	97,11	148,5	262,44	54,27
Liczba chorych		4	19	23	9

(OUN – ośrodkowy układ nerwowy)

Najniższe średnie stężenie TF w chwili diagnozy 38,6225 pg/ml (16,49 - 69,49pg/ml) stwierdzono w podgrupie z guzami ośrodkowego układu nerwowego, zaś najwyższe 58,9826 pg/ml (28,9 - 118,54pg/ml) w grupie z guzami zarodkowymi i w grupie z mięsakami oraz guzami kości - 58,8111pg/ml (14,243 - 133,3pg/ml). Po zastosowanym leczeniu najniższe średnie stężenie TF - 29,3334 pg/ml (5,98 - 54,27pg/ml) wystąpiło w grupie z rozpoznaniem chłoniakiem Hodgkina, a najwyższe 82,1574 pg/ml w grupie guzów zarodkowych (32,2 -

262,44 pg/ml). Zaobserwowano, po leczeniu onkologicznym, wzrost średniego stężenia czynnika tkankowego w grupie chorych z nowotworami ośrodkowego układu nerwowego i grupie z guzami zarodkowymi oraz obniżenie w grupie złośliwych mięsaków tkanek miękkich i guzach kości oraz w grupie z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina.



Wykres 22. Stężenie czynnika tkankowego TF w surowicy, przez i po leczeniu chorych w zależności od rozpoznania histopatologicznego.

Wykazano istotną różnicę wartości średniego stężenia TF w surowicy, w zależności od rozpoznania histopatologicznego ($p < 0,025$). Jednocześnie stwierdzono istotny wpływ terapii przeciwnowotworowej na stężenie TF ($p < 0,05$). W podgrupach z nowotworami pochodzenia zarodkowego i guzami ośrodkowego układu nerwowego, średnie stężenie TF w surowicy po leczeniu przeciwnowotworowym wzrosło, a w podgrupach z rozpoznaniem mięsaków i guzów kości oraz chłoniaków Hodgkina średnie stężenia TF były niższe, niż w momencie rozpoznania.

3. Stężenie TF u dzieci ze wznową i w grupie z pierwotnym zachorowaniem.

Oznaczono stężenie TF w grupie 49 pacjentów z pierwotnym rozpoznaniem choroby nowotworowej i w grupie sześciu dzieci z rozpoznaną wznową procesu nowotworowego. W

grupie dzieci z pierwotnie rozpoznanym nowotworem stężenia TF kształtowały się od 0,4 do 133,3 pg/ml, ze średnią 57,158 pg/ml. Po leczeniu stężenie czynnika tkankowego mieściło się w granicach od 0 do 262,44 pg/ml, średnio 63,257 pg/ml (wzrost wartości średniej po leczeniu o 6,1 pg/ml). W grupie ze wznową, przed leczeniem, stężenia TF wahały się od 17,06 do 69,49 pg/ml, średnia 42,93 pg/ml. Po leczeniu stężenie TF w tej grupie, wynosiło od 0 do 89,76 pg/ml - średnia 51,491 pg/ml (wzrost wartości średniej o 8,56 pg/ml). W chwili diagnozy średnie stężenie TF w grupie z pierwotnym nowotworem u dzieci było wyższe, niż we wznowie choroby, zarówno przed jak i po leczeniu onkologicznym. W trakcie leczenia w obu grupach chorych stwierdzono nieznamienny wzrost średnich stężeń TF w surowicy, wyższy w grupie chorych ze wznową ($p=0,90$).

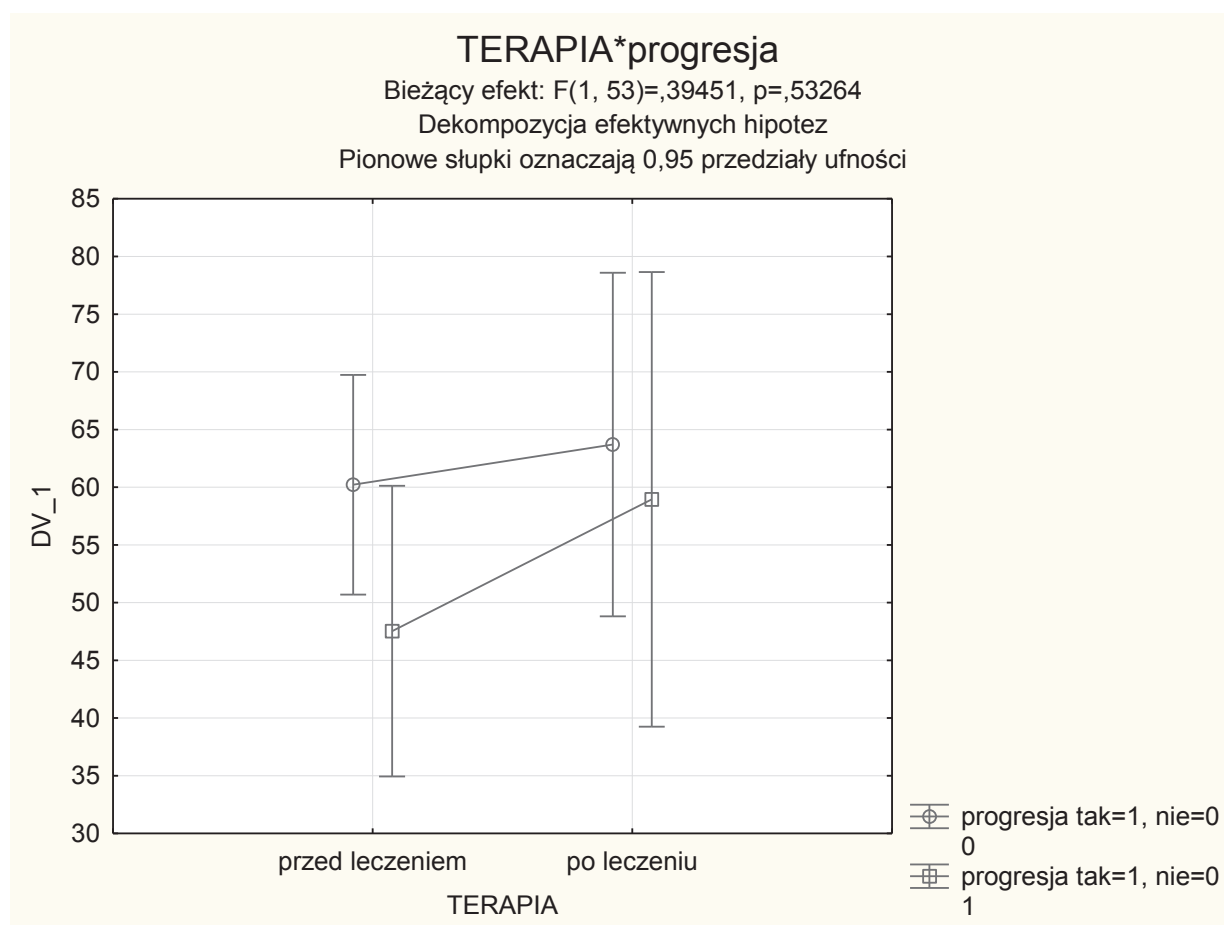
4. Stężenie TF w surowicy w zależności od stadium zaawansowania choroby.

Wartości stężenia czynnika tkankowego w grupie 33 dzieci ze zlokalizowaną chorobą nowotworową w chwili diagnozy wyniosły od 0,4 do 133,3 pg/ml - średnia 56,576 pg/ml. Po leczeniu onkologicznym stężenie TF wyniosło od 0 do 262,44 pg/ml, przy średniej wynoszącej 60,147 pg/ml (po leczeniu wzrost średniej o 3,571 pg/ml). W grupie chorych w IV stopniu zaawansowania uzyskano 21 wyników. W chwili diagnozy rozsianej choroby nowotworowej, stężenia TF wahały się w przedziale od 14,243 do 87,75 pg/ml, a średnia 53,816 pg/ml. Po leczeniu onkologicznym uzyskano wyniki stężenia TF od 22,14 do 129,53 pg/ml - średnia 65,607 pg/ml (po leczeniu wzrost wartości średniej o 11,792 pg/ml). Stężenia TF przed leczeniem onkologicznym, niezależnie od stopnia zaawansowania, były niższe niż po leczeniu. Różnice średnich wartości TF przed i po leczeniu, w obu grupach chorych były nieznamienne ($p=0,52$).

Zwrócono uwagę na grupę chorych z rozpoznaniem złośliwych mięsaków tkanek miękkich i guzów kości. Wśród tych chorych, w grupie z obecnością przerzutów, wartości TF w chwili diagnozy wahały się od 14,24 do 80,15pg/ml, ze średnią 49,529pg/ml, a po leczeniu wartości TF wynosiły od 22,14 do 125,73pg/ml, średnia 60,127pg/ml. W grupie chorych z rozpoznaniem zlokalizowanego mięsaka, wartość średnia TF przed leczeniem wynosiła 69,124pg/ml (zakres od 18,75pg/ml do 133,3pg/ml), w trakcie obserwacji ulegała zdecydowanemu obniżeniu 45,82pg/ml (od 0 do 148,5pg/ml). **Różnica wartości TF w grupie złośliwych mięsaków i guzów kości, w zależności od stopnia zaawansowania, wykazywała znamienność statystyczną ($p<0,05$).**

5. Stężenie TF w surowicy w zależności od odpowiedzi na leczenie.

Uzyskano wyniki wartości stężeń TF w momencie diagnozy choroby, u 35 chorych z pozytywną odpowiedzią na leczenie i u 20 chorych z progresją choroby nowotworowej. Wartości TF w grupie z pozytywną odpowiedzią wahały się od 0,4 do 133,3 pg/ml, a średnia wyniosła 60,219 pg/ml (SD 4,745). W badaniach kontrolnych po zastosowanym leczeniu, stężenia TF w tej grupie wahały się w zakresie od 0 do 261,44 pg/ml, a średnia wyniosła 63,701 pg/ml (SD 7,423). Wzrost średniego stężenia TF w trakcie leczenia wyniósł 3,482 pg/ml. U chorych z progresją choroby nowotworowej w trakcie obserwacji klinicznej, wyjściowo uzyskano wyniki TF w przedziale od 14,243 do 80,77 pg/ml, ze średnim stężeniem 47,532 pg/ml (SD 6,278). Po zastosowaniu terapii stężenia TF wynosiły od 23,83 do 97,11 pg/ml, średnia 58,952 pg/ml (SD 9,82). W grupie z progresją, wzrost średniej wartości TF w trakcie leczenia choroby wyniósł 11,42 pg/ml. W obu porównywanych grupach zaobserwowano wzrost stężenia TF po zastosowaniu leczenia, lecz w grupie z progresją choroby wzrost stężenia TF był większy, lecz różnica nie była statystycznie znamienna ($p=0,53$).



Wykres 23. Stężenia TF u chorych w zależności od odpowiedzi na stosowane leczenie.

W grupie chorych, którzy w dalszej obserwacji zmarli z progresji nowotworu, wartość TF w chwili diagnozy mieściła się w granicach od 14,243 do 79,07 pg/ml, średnia 49,044 pg/ml. W badaniu kontrolnym TF wynosił od 23,83 do 97,11 pg/ml, zaś średnia 56,191 pg/ml (wzrost wartości średniej o 7,147pg/ml).

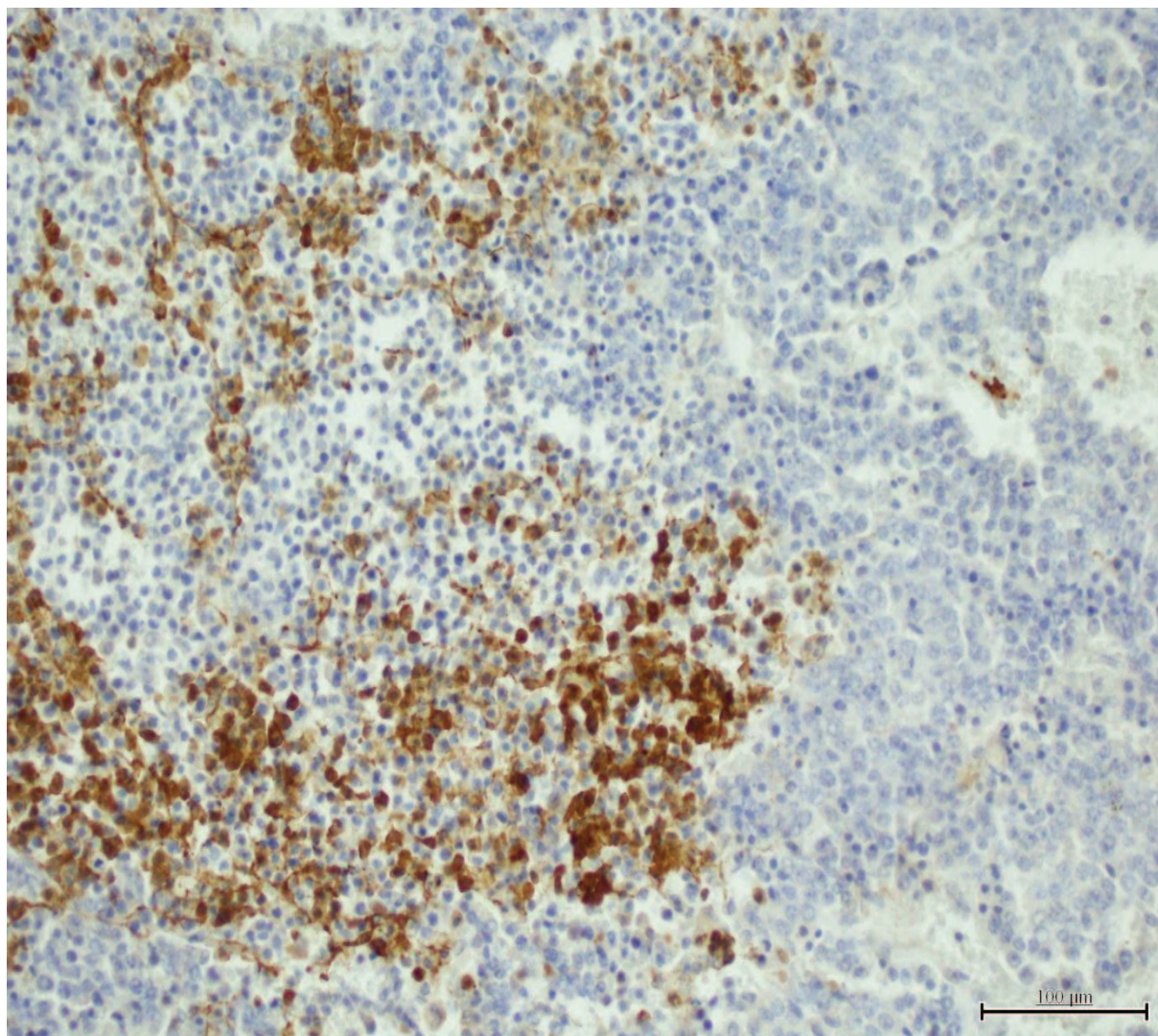
IV. Badania immunohistochemiczne wybranych czynników krzepnięcia w tkankach nowotworowych.

Określono ekspresję antygenów: antytrombiny III (AT III) i czynnika tkankowego (TF) w 27 wycinkach tkanki nowotworowej. Celem jakościowej oceny nasilenia ekspresji badanych antygenów w komórkach nowotworowych, posłużono się stworzonym na potrzeby tego badania systemem numerycznym w zakresie od 0 do 9 wg tabeli nr 8. Ekspresję AT III i TF stwierdzano w komórkach nowotworowych w obrębie cytoplazmy. Siła odczynu wykazywała zróżnicowanie i heterogenność dystrybucji. W guzach neuroblastycznych immunoreaktywność stwierdzano w komponencie neuronalnym i w podścielisku Schwannian.

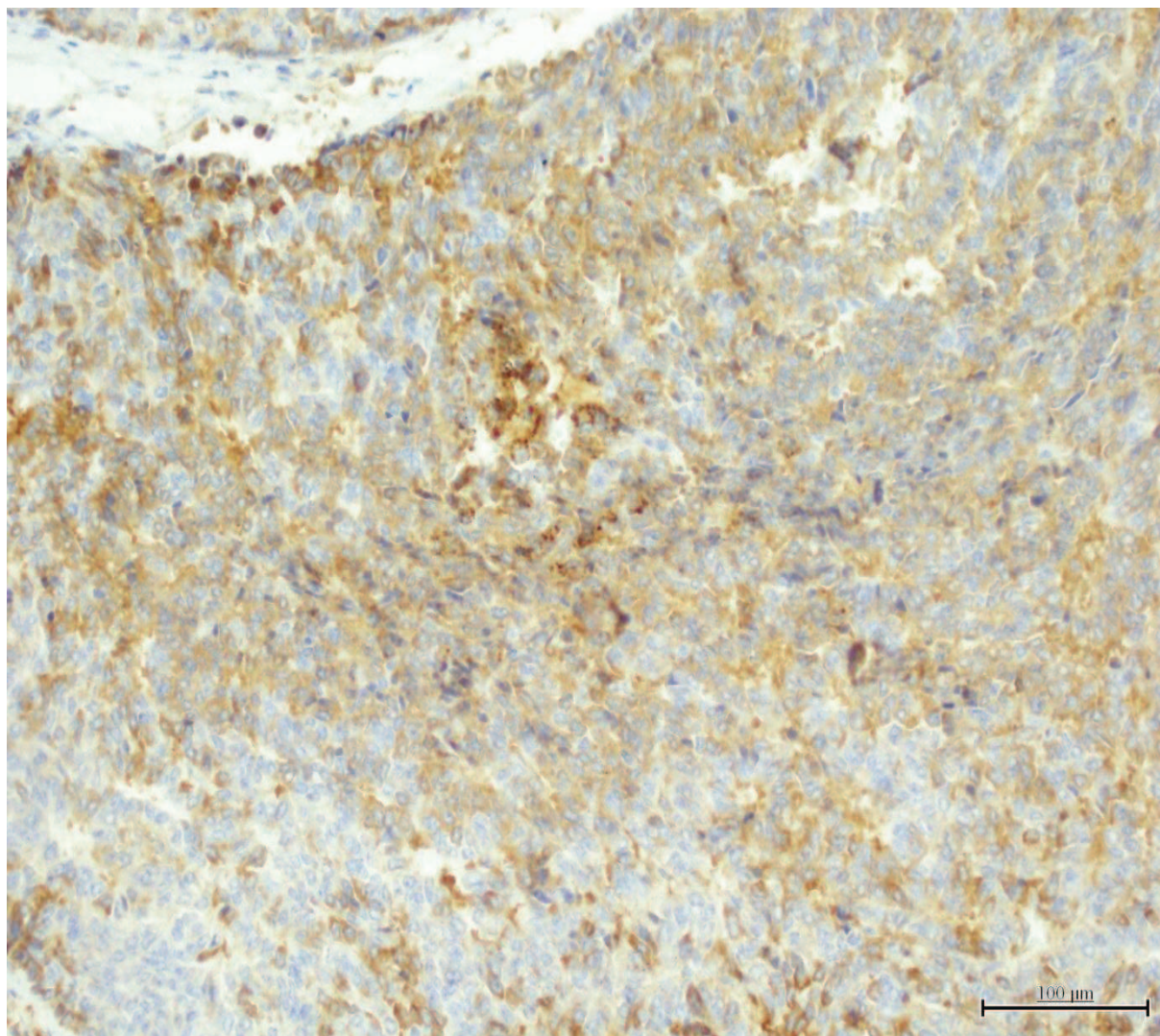
W ścianie naczyń nowotworowych określono siłę ekspresji antygenów: antytrombiny III, czynnika tkankowego TF i czynnika krzepnięcia VIII (FVIII). Ponadto oceniano płytkowo-śródbłonkową cząsteczkę adhezji komórkowej - CD31, posługując się skalą w zakresie 0 - 3. Reakcja z antygenem CD 31 służyła do lokalizacji struktur naczyniowych w tkance nowotworowej.

1. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA

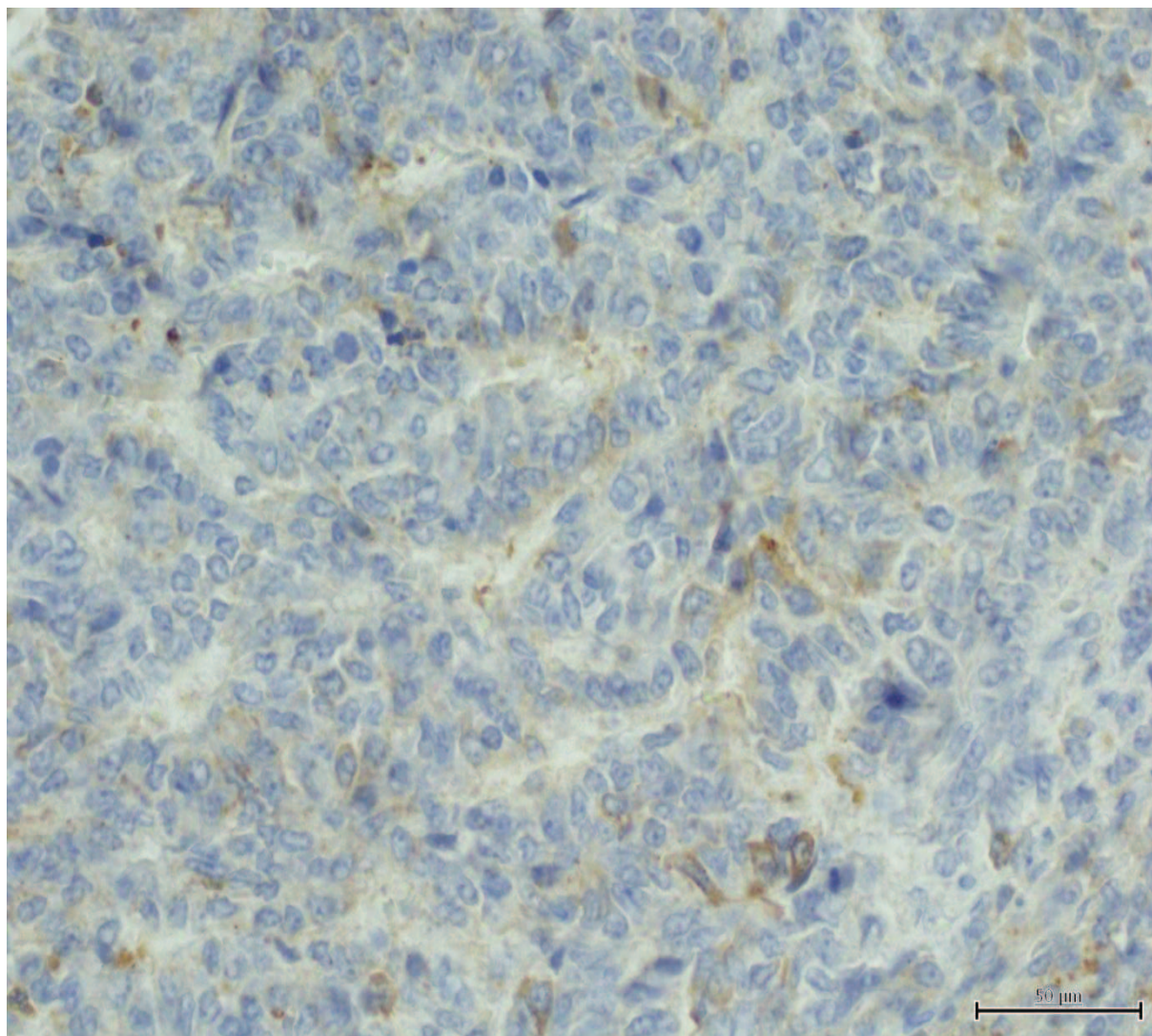
Fotografie nr 1-6 przedstawiają odczyny immunohistochemiczne na obecność badanych antygenów w wybranych dziecięcych guzach nowotworowych. Przedstawione na fotografiach (1-6) preparaty immunohistochemiczne wykonane zostały przez dr Karolinę Gizelbach-Żochowską w Zakładzie Patomorfologii Podmiotu Leczniczego COPERNICUS w Gdańsku (kierownik – dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska). Obrazują one w tkance nowotworowej wybranych guzów dziecięcych ekspresję badanych antygenów: czynnika tkankowego (TF), antytrombiny III (AT III), czynnika krzepnięcia VIII (FVIII) oraz płytkowo-śródbłonkowej cząsteczki adhezji komórkowej - CD31.



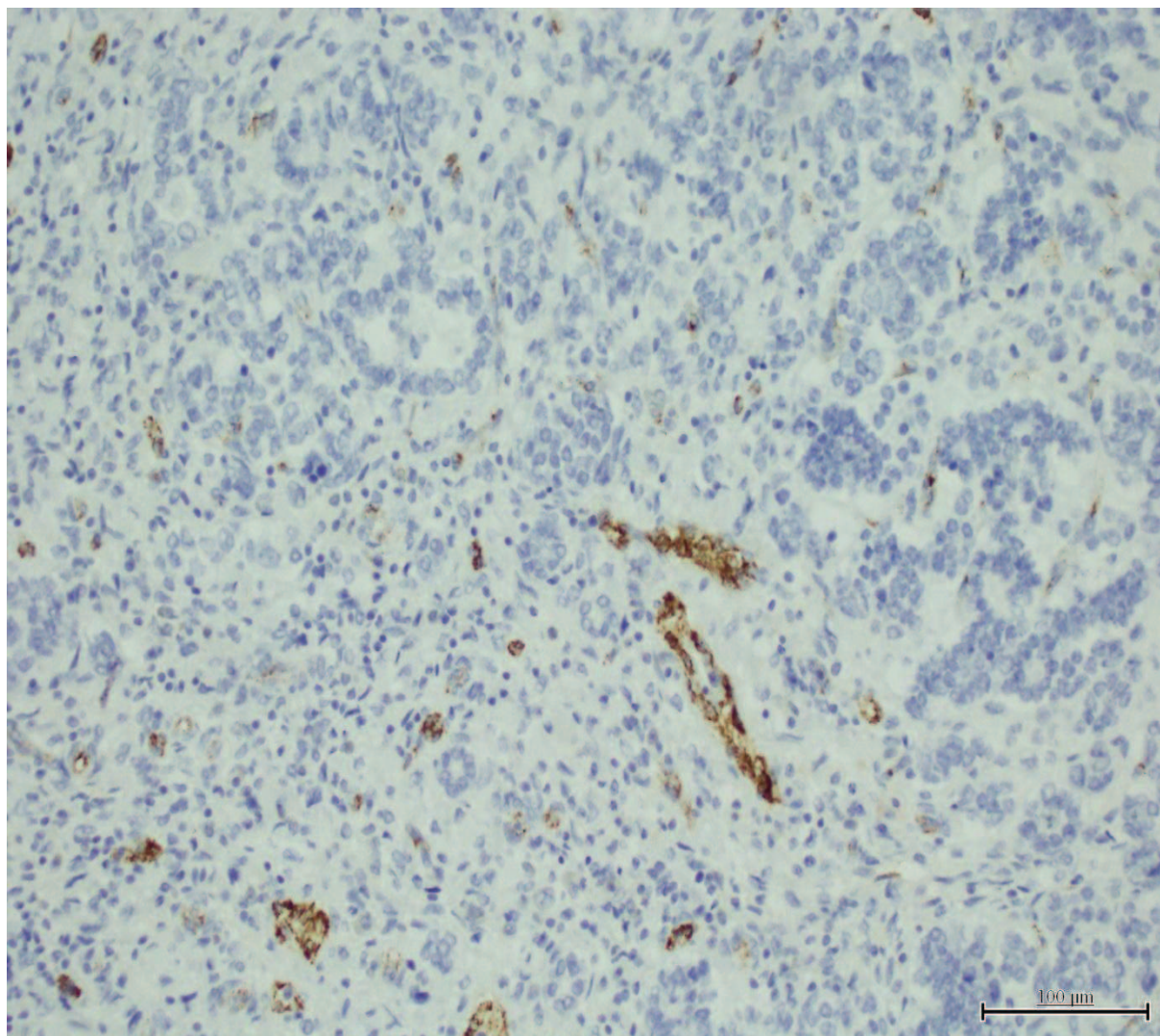
Fotografia 1. Mięsak Ewing'a – preparat immunohistochemiczny. Komórki znakowane przeciwciałami p/w TF (pow. mikroskop 200x). Silna ekspresja TF (+++).



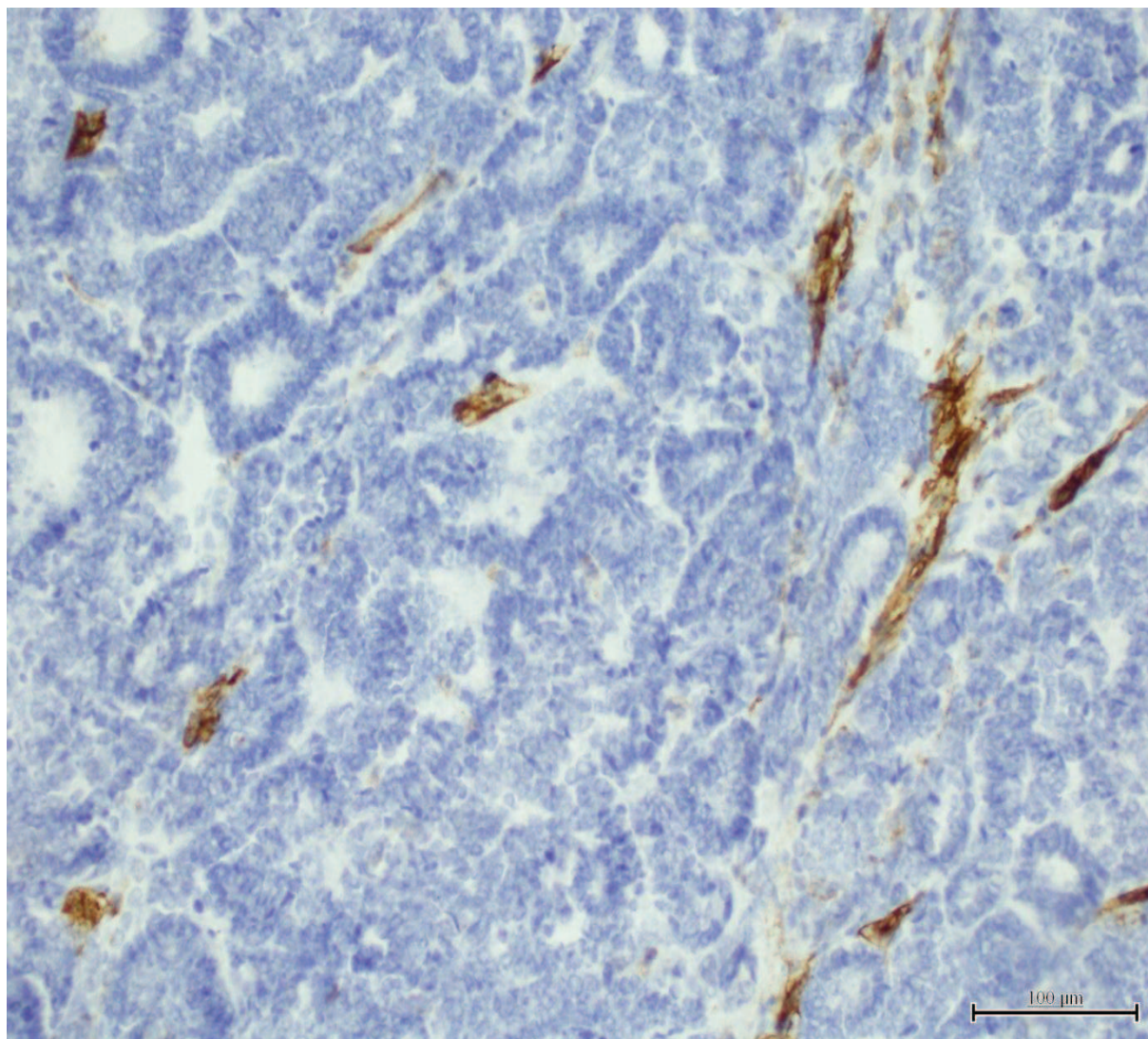
Fotografia 2. Guz Wilms'a komponenta epitelialno-blastemiczna - preparat immunohistochemiczny. Komórki znakowane przeciwciałami p/w AT III (pow. mikroskop 200x). Silna ekspresja (+++) AT III w komórkach nowotworowych.



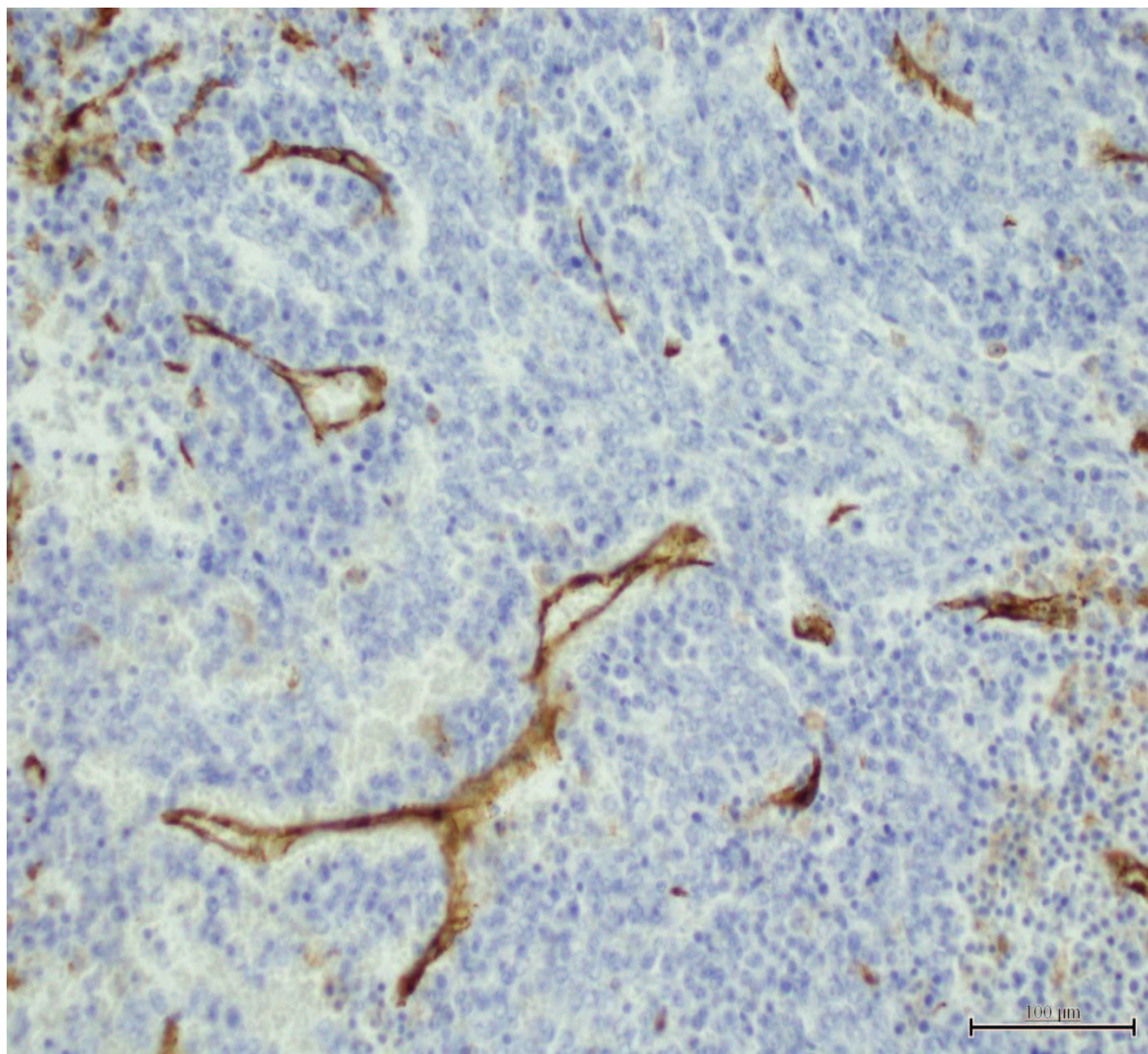
Fotografia 3. Guz Wilms'a - preparat immunohistochemiczny. Naczynia znakowane przeciwciałami p/w AT III (pow. mikroskop 400x). Silna ekspresja (+++) AT III w naczyniach guza.



Fotografia 4. Guz Wilms'a - preparat immunohistochemiczny. Naczynia znakowane przeciwciałami p/w FVIII (pow. mikroskop 200x). Silna ekspresja FVIII w naczyniach guza.



Fotografia 5. Guz Wilms'a - preparat immunohistochemiczny. Naczynia znakowane przeciwciałami p/w CD 31 (pow. mikroskop 200x). Silna ekspresja (+++) CD 31 w naczyniach guza.



Fotografia 6. Zwojak zarodkowy współczulny - preparat immunohistochemiczny. Naczynia znakowane przeciwciałami p/w CD 31 (pow. mikroskop 200x). Silna ekspresja (+++) CD 31 w naczyniach guza.

2. Odczyny immunohistochemiczne w komórkach nowotworowych.

Rozkład intensywności odczynu immunohistochemicznego AT III w komórkach nowotworowych przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Intensywność ekspresji antygenu AT III w wycinkach tkanek badanych nowotworów.

Rozpoznanie nowotworowe	Liczba chorych	Siła odczynu AT III w komórkach nowotworowych, zakres 0-9									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Guz Wilms'a	8	1	0	0	0	0	0	2	1	1	3
Inne guzy nowotworowe	19	1	2	0	0	1	4	2	6	2	1
Ogółem	27	2	2	0	0	1	4	4	7	3	4

Zakres intensywności odczynów: 0-9 punktów. Inne guzy nowotworowe = mięsaki i guzy zarodkowe. AT III – antytrombina III.

Analiza wyników wskazuje, że w preparatach z guzami Wilms'a o budowie nabłonkowo-mezenchymalnej uzyskano wysoką ekspresję odczynów z antytrombiną III, najniższą oceniono na 6 punktów, a najwięcej było odczynów najsilniejszych, o sile ekspresji 9 punktów. Zwrócono uwagę na silną ekspresję antygenu w licznych (60-100%) komórkach guza Wilms'a o utkaniu nabłonkowo-mezenchymalnym (histologia pośredniego ryzyka wg klasyfikacji SIOP (57). Badanie patomorfologiczne wykonano u ośmiu dzieci z guzem Wilms'a. Budowę nabłonkowo-mezenchymalną guza Wilms'a wykazano u 7 chorych, zaś u jednego chorego guz miał budowę blastemiczną. W przypadku tego jednego guza Wilms'a, z dominującą blastemiczną komponentą histologiczną, ekspresja AT III nie występowała. W grupie innych guzów nowotworowych stwierdzono w czterech na dziewiętnaście przypadków, słabą ekspresję antytrombiny III (< 5 punktów). Były to nowotwory: zwojak zarodkowy współczulny – dwa przypadki i mięśniakomięsak prążkowany komórkowy – 2 przypadki. Najsilniejszą ekspresję antytrombiny III w tej grupie, o sile 8-9 punktów, wykazano w następujących guzach: wątrobiak zarodkowy, rak kosmówki i guzie Ewing'a. W tabeli 18 porównano intensywność ekspresji antygenu AT III, w wycinkach tkanek pozostałych guzów poza guzem Wilms'a.

Tabela 18. Intensywność ekspresji antygenu AT III w wycinkach tkanek pozostałych nowotworów (z wykluczeniem guza Wilms'a).

Rozpoznanie nowotworów	Liczba chorych	Siła odczynu AT III w komórkach nowotworowych, zakres 0-9									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mięsak prążkowanokomórkowy	7	1	0	0	0	1	3	0	2	0	0
Mięsak Ewing'a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Guz germinalny	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Neuroblastoma	8	0	2	0	0	0	1	2	3	0	0
Hepatoblastoma	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Ogółem	19	1	2	0	0	1	4	2	6	2	1

Zakres intensywności odczynów: 0-9 punktów. AT III – antytrombina III

Stwierdzono dużą rozpiętość siły ekspresji antytrombiny III w komórkach nowotworowych zarówno mięsaków jak i guzów zarodkowych. W przypadku mięsaków tkanek miękkich dominowały odczyny średnie o sile 5 – 7 punktów. Jedyny oceniany guz kości – mięsak Ewing'a, charakteryzował się wysoką ekspresją antytrombiny III w komórkach nowotworowych. W grupie guzów zarodkowych (guz germinalny, neuroblastoma, hepatoblastoma) przeważały odczyny średnie i silne. Ekspresję o sile oceny 6 punktów i więcej, stwierdzono w 8/11 guzów zarodkowych. Różnice w ocenie ekspresji antytrombiny III w badanych guzach, nie były statystycznie istotne ($p > 0,05$). Analiza badań immunohistochemicznych AT III wykazała, że **największa ekspresja antytrombiny III w komórkach nowotworowych występuje w postaci epitelialno-mezenchymalnej guza Wilms'a i jest istotnie wyższa, niż w grupie pozostałych badanych nowotworów ($p=0,035$).**

Ekspresja czynnika tkankowego TF w obrębie komórek nowotworowych oceniana w 27 guzach, była słaba lub umiarkowana (tabela 19).

Tabela 19. Intensywność ekspresji antygenu TF w komórkach wycinków tkanek nowotworów dziecięcych.

Rozpoznanie nowotworów	Liczba chorych	Siła odczynu TF w komórkach nowotworowych, zakres 0-9									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mięsak prążkowanokomórkowy	7	1	2	1	0	0	0	0	3	0	0
Mięsak Ewing'a	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Guz germinalny	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Neuroblastoma	8	0	1	0	0	2	0	2	3	0	0
Hepatoblastoma	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Guz Wilms'a	8	1	3	0	0	2	0	2	0	0	0
Ogółem	27	2	6	1	0	4	0	4	10	0	0

Zakres intensywności odczynów: 0-9 punktów.

Odczynów TF o sile 8-9 punktów w komórkach nowotworowych nie stwierdzono w żadnym badanym nowotworze. W obrębie komórek różnych badanych nowotworów, stwierdzono umiarkowaną siłę ekspresji. Odczyny o sile 5 – 7 punktów w obrębie komórek nowotworowych stwierdzono w 14 wycinakach guzów o pochodzeniu embrionalnym lub grupie mięsaków. W 13 z 26 wycinkach ekspresja TF była słaba, o sile 5 punktów lub mniej. Nie wykazano istotnych różnic statystycznych w ekspresji TF w komórkach w zależności od rozpoznania typu histologicznego nowotworu.

3. Odczyny immunohistochemiczne w naczyniach nowotworowych.

W naczyniach nowotworowych 26 badanych preparatów, określono ekspresję trzech antygenów, związanych z procesem hemostazy: AT III, TF, FVIII. Zaobserwowano znaczną ekspresję czynnika VIII w obrębie komórek śródbłona naczyń w większości badanych przypadków. Siła odczynu na obecność antygenu FVIII wykazywała dużą zmienność. Wykazano korelację siły ekspresji FVIII ze stadium zaawansowania choroby nowotworowej (tabela 20).

Tabela 20. Siła ekspresji antygenu FVIII w naczyniach nowotworowych w zależności zaawansowania choroby nowotworowej.

Obecność przerzutów	Siła ekspresji immunohistochemicznej antygenu FVIII w naczyniach nowotworowych wg skali 1-3			Liczba chorych badanych IHC
	stopień 1	stopień 2	stopień 3	
Nie	4	1	12	17
Tak	4	3	2	9
Ogółem	8	4	14	26

(IHC – immunohistochemicznie)

W grupie guzów zlokalizowanych wykonano 17 badań immunohistochemicznych, zaś w grupie guzów w IV stopniu zaawansowania klinicznego wykonano 9 badań. W większości guzów zlokalizowanych naczynia nowotworowe wykazały wysoką ekspresję antygenu FVIII (12 na 17 odczynów immunohistochemicznych o najwyższej sile). W guzach rozsianych (9 badań) naczynia nowotworowe wykazywały w większości odczyny słabe – cztery guzy, lub umiarkowane – trzy guzy. Silne odczyny stwierdzono tylko w dwóch guzach w czwartym stadium zaawansowania. **Różnica ekspresji antygenu FVIII w naczyniach tkanki nowotworowej między postaciami zlokalizowanymi i rozsianymi nowotworu, była statystycznie znamienna ($p < 0,05$).** W tkance nowotworowej ekspresja FVIII była wysoka w chorobie zlokalizowanej, a niska w chorobie rozsianej.

Analiza ekspresji FVIII w odniesieniu do innych cech klinicznych choroby nowotworowej (typu histologii, odpowiedzi na leczenie, etap choroby) nie wykazała różnic statystycznie istotnych.

Ekspresja antygenu TF w naczyniach badanych wycinków nowotworów była słaba. Ekspresję o natężeniu 1 punktu stwierdzono w dziesięciu guzach na 27 przypadków. Dodatkowo odczyny występowały głównie w grupie guzów zarodkowych, w pięciu guzach Wilms'a, dwóch przypadkach neuroblastoma i mięsaka tkanek miękkich oraz w jednym przypadku hepatoblastoma. W pozostałych guzach reakcja immunohistochemiczna z antygenem TF w naczyniach nie występowała. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na przeprowadzenie analizy statystycznej.

Ekspresja antygenu antytrombiny III w naczyniach nowotworowych była zmienna, dotyczyła śródbłonna i miejscami błony mięśniowej, a jej wyniki przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Intensywność ekspresji antygenu AT III w naczyniach nowotworowych.

	Liczba chorych	Siła ekspresji immunohistochemicznej antygenu AT III w naczyniach nowotworowych wg skali 0-3			
		stopień 0	stopień 1	stopień 2	stopień 3
Mięsak prążkowano komórkowy	7	1	1	4	1
Mięsak Ewing'a	1	0	1	0	0
Guz germinalny	1	0	0	1	0
Neuroblastoma	8	2	3	2	1
Hepatoblastoma	2	0	0	1	1
Guz Wilms'a	8	0	2	3	3
Liczba badanych guzów	27	3	7	11	6

(AT III – antytrombina III)

W trzech guzach (dwa przypadki zwojaka współczulnego zarodkowego i jeden mięśniakomięsaka prążkowano komórkowego) ekspresja była nieobecna, a w pięciu guzach z podgrupy guzów zarodkowych (trzy przypadki nerczaka płodowego, po jednym wątrobiaka zarodkowego, zwojaka współczulnego zarodkowego) i jednym przypadku mięsaka prążkowanokomórkowego – bardzo silna. Pozostałe guzy – 7 przypadków, miały słabą, lub umiarkowaną ekspresję – 11 badanych guzów. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji AT III w naczyniach nowotworowych w odniesieniu do analizowanych danych klinicznych.

Dyskusja.

Choroba nowotworowa w Polsce jest rozpoznawana u około 1200 dzieci i młodzieży rocznie, a terapią onkologiczną objętych jest rocznie około 2000 chorych w wieku 0 – 18 lat. Wyleczalność z choroby nowotworowej, która została rozpoznana w wieku rozwojowym, wynosi około 80% (58). Dalsza poprawa wyników stosowanej obecnie terapii nowotworów dziecięcych będzie możliwa tylko w przypadku rozszerzenia dotychczas stosowanych metod leczenia. W poszukiwaniu nowych sposobów terapii, niezbędne jest dalsze pogłębienie badań dotyczących biologii i patomechanizmów rozwoju nowotworów. Wyniki dotychczasowych badań przeprowadzonych u ludzi dorosłych z chorobą nowotworową, wskazują że mechanizmy hemostazy są znacząco modyfikowane przez proces nowotworowy, a niektóre negatywne zmiany tj. powikłania zakrzepowo-zatorowe mogą wpływać na przebieg kliniczny choroby, ograniczać możliwości leczenia oraz prawdopodobieństwo wyleczalności nowotworu (59). Udowodniono w nowotworach wieku dorosłego, że niektóre czynniki zaangażowane w procesie krzepnięcia jak czynnik tkankowy i trombina, odgrywają istotną rolę w stymulacji procesu wzrostu i rozsiewu nowotworu (60, 61). Zasadniczym elementem procesu krzepnięcia zapewniającym hemostazę, są płytki krwi powstające w szpiku kostnym poprzez odszczepianie od megakariocytów. W mechanizmie degranulacji ziarnistości płytkowych oraz uwolnienia ich zawartości, przy współudziale licznych receptorów błonowych płytek, dochodzi do aktywacji, adhezji i agregacji płytek krwi. Następstwem tych procesów jest wytworzenie pierwotnego czopu płytkowego. Nieprawidłowo funkcjonujące płytki krwi, tworząc skrzeplinę w miejscu pękniętej blaszki miażdżycowej tętnic wieńcowych lub mózgowych, są odpowiedzialne za rozwój objawów w przebiegu choroby wieńcowej, czy w udarach mózgu (6, 7). Płytki krwi współuczestniczą również w sposób pośredni i bezpośredni w procesach związanych z rozwojem nowotworu. Są zaangażowane w procesy aktywacji śródbłonna naczyniowego, wydzielanie biologicznie aktywnych cytokin modulujących reakcję zapalną i regulację procesów odpornościowych. Aktywacja płytek krwi przez nowotwór, jak również stymulacja angiogenezy przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) i zmiana stanu śródbłonna naczyniowego dokonuje się przy udziale wielu innych czynników krzepnięcia (m.in. trombina, czynnik tkankowy, fibrynogen, czynnik von Willebranda) pierwotnie uczestniczących w procesach hemostazy. Wszystkie te czynniki wpływają na wzrost guza pierwotnego, wzrost naczyń nowotworowych oraz powstawanie przerzutów odległych nowotworu (62, 63, 64, 65). Problem wielopłaszczyznowego wzajemnego związku układu krzepnięcia i choroby nowotworowej w nowotworach

dziecięcych był podejmowany w badaniach różnych autorów, ale dotychczas rola poszczególnych czynników tego układu w rozwoju chorób nowotworowych nie została ostatecznie określona. Niewiele z tych badań dotyczy nowotworów wieku dziecięcego. Stąd też obecna analiza zależności wybranych czynników układu krzepnięcia w odniesieniu do obrazu klinicznego i odpowiedzi na leczenie w wybranych nowotworach u dzieci, może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na ten temat. W przedstawianej pracy podjęto analizę wybranych wskaźników hemostazy w złośliwych nowotworach wieku dziecięcego, które nie pochodzą z tkanki krwiotwórczej.

1. Laboratoryjne wskaźniki układu krzepnięcia.

W dotychczasowych opublikowanych badaniach dotyczących ludzi dorosłych wykazano, że u połowy chorych z nowotworem oraz 90% pacjentów w rozsianej postaci choroby, występują nieprawidłowe parametry układu krzepnięcia (66). W przeprowadzonych w tej pracy badaniach u dzieci, podstawowe parametry krzepnięcia odniesiono do typu nowotworu, stopnia zaawansowania klinicznego choroby oraz uzyskanej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe. Analiza tych wyników, uzyskanych w momencie diagnozy nowotworu, potwierdziła istotne różnice w wartościach niektórych parametrów krzepnięcia w porównaniu z wartościami po uzyskaniu remisji choroby, jak również stwierdzono występowanie różnic w zależności od typu nowotworu i zaawansowania choroby. Stwierdzono, że liczba płytek krwi u większości chorych pozostawała w zakresie normy, lecz zauważono, że średnie wartości liczby płytek krwi w momencie diagnozy, różniły się w zależności od typu nowotworu. Wskazuje to na różnice w ich zaangażowaniu w rozwój nowotworu, zależne od rodzaju choroby nowotworowej. Stwierdzono również, że niższe średnie wartości płytek krwi w chwili diagnozy występowały w grupie chorych, u których odpowiedź na leczenie była niekorzystna, z rozpoznaniem wznowy lub progresji w dalszej obserwacji. Ta obserwacja wskazywać może na prognostyczne znaczenie liczby płytek krwi, oznaczanej w momencie diagnozy. Podwyższona liczba płytek krwi jako pozytywny czynnik prognostyczny w momencie diagnozy nowotworu u dorosłych, opisane została przez Ilhan-Mutlu A. (67). Badania ostatnich lat potwierdzają ważną rolę jaką płytki krwi odgrywają w kancerogenezie. (68, 69).

Znamiennie wyższa liczba płytek krwi w momencie diagnozy występowała w przypadku zaawansowanej, rozsianej choroby nowotworowej, niż w postaci zlokalizowanej. Należy jednak mieć na uwadze, że liczba płytek krwi może podlegać dużym wahaniom w

przebiegu choroby nowotworowej. Towarzyszące procesom nowotworowym rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (DIC) lub obecność przerzutów do szpiku kostnego powoduje obniżenie wartości płytek krwi. Wpływ na obniżenie liczby płytek krwi mają również przeprowadzane procedury diagnostyczne i terapeutyczne – jak przeprowadzenie zabiegu operacyjnego, podaż systemowej chemioterapii lub radioterapia (70). Nowotwór poprzez stymulację produkcji cytokin zapalnych: IL-1, IL-6, IL-11 może stymulować nadpłytkowość, co zaobserwowano u 10-60% chorych dorosłych (70, 71, 72). Warto zauważyć, że stan nadpłytkowości występuje w wielu innych niż choroba nowotworowa, ostrych i przewlekłych stanach współistniejących ze stanem zapalnym jak: nieswoiste zapalenia jelit, reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, czy posocznica i ostre zespoły wieńcowe (7, 62). W przypadku nowotworów, stan zapalny wywołany jest przez połączenie płytek krwi i trombiny, które wyzwalają reakcje komórkowe, których efektem jest wzrost produkcji cytokin prozapalnych i cząstek adhezyjnych uczestniczących także w aktywacji granulocytów. Uważa się, że płytki krwi spełniają ważną rolę w rozwoju choroby nowotworowej. Komórki nowotworowe opłaszczane przez płytki krwi podlegają parakrynej stymulacji proliferacji. Ponadto w wyniku opłaszczenia, komórki nowotworowe ulegają swobodnemu rozsiewowi drogą krwiopochodną, uzyskując zdolność do przylegania do śródbłona, co ułatwia tworzenie przerzutów odległych, a także trudniej zostają zidentyfikowane przez układ odpornościowy (62).

W przypadku nowotworów rozpoznawanych u ludzi dorosłych, zwiększona liczba płytek krwi występuje w stanach rozsiewu procesu nowotworowego, stąd nadpłytkowość jest określana jako marker wysokiego zaawansowania choroby i złej prognozy. W przypadku raka płuca, szyjki macicy udowodniono, że nadmierna liczba płytek krwi jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym choroby. (70, 73).

Analiza czynników krzepnięcia, w przeprowadzonych w tej pracy badaniach, w chwili rozpoznania nowotworu wykazała znamienne wyższe stężenia fibrynogenu i D-dimeru w porównaniu z wartościami po zastosowanym leczeniu onkologicznym. W nowotworach płuc wysokie wartości tych parametrów występują w przypadkach wyższego stopnia zaawansowania, z obecnością przerzutów oraz związane są z krótszym przeżyciem chorych (74, 75). D-dimer, jako produkt rozpadu fibryny jest selektywnym markerem aktywacji krzepnięcia, zaś fibrynogen nie tylko bierze udział w procesie krzepnięcia jako białko substratowe dla reakcji tworzenia fibryny, ale dodatkowo jest wskaźnikiem stanu zapalnego jako białko ostrej fazy. Wysokie wartości fibrynogenu mogą więc być efektem nie tylko

pobudzenia układu krzepnięcia, lecz wynikać z udziału reakcji zapalnej wyzwalanej w procesie nowotworowym. Podobne znaczenie i rolę fibrynogenu jako czynnika krzepnięcia oraz jako białka stanu zapalnego w rakach jelita grubego, wykazał Son HJ i współautorzy (76). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że wyższe wartości D-dimeru i fibrynogenu w chwili diagnozy nowotworu, korelowały z niekorzystnym przebiegiem klinicznym choroby nowotworowej. W przypadku wznowy lub progresji nowotworu wartości wstępne tych parametrów były znamienne wyższe, a po zastosowanej terapii, nie ulegały obniżeniu wartości do takich poziomów, jak w grupie chorych, którzy uzyskali całkowitą remisję. Piśmiennictwo wskazuje, że nieprawidłowo wysokie wartości fibrynogenu i D-dimeru mogą być czynnikami złej prognozy w nowotworach u dorosłych.

Istnieją jedynie pojedyncze doniesienia naukowe dotyczące odchyłeń w badaniach parametrów układu krzepnięcia w chorobach nowotworowych u dzieci, a te publikacje dotyczą głównie hematologicznych chorób nowotworowych. Praca Giordano i wsp. (77) wskazuje na wysokie stężenia D-dimeru u dzieci w chwili rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) i opisuje wpływ prowadzonej terapii na jego normalizację. Udowodniono, że komórki blastyczne ALL poprzez aktywację śródbłonna naczyniowego stymulują produkcję i uwalnianie czynnika von Willebranda. Czynniki te stymulują proces krzepnięcia aktywując płytki krwi, pobudzając ich adhezję do śródbłonna i uczestnicząc w powstaniu skrzepu, czego wykładnikiem jest wzrost stężenia D-dimeru i trombiny (78). W wielu pracach dotyczących białaczek u dzieci, określono czynniki wpływające na indukowanie stanu nadkrzepliwości, jak wstępna hiperleukocytoza i stosowanie terapii do której należą m.in.: steroidoterapia, leczenie L-asparaginazą, a także towarzyszące ciężkie powikłania infekcyjne (27, 79, 80). W litych złośliwych nowotworach dziecięcych zachowanie się mechanizmów hemostazy nie zostało dotychczas w pełni określone, choć istnieją doniesienia opisujące jawne klinicznie powikłania zakrzepowe w przebiegu takich nowotworów jak zwojak zarodkowy współczulny, czy mięsaki tkanek miękkich u dzieci (23, 81, 82). W przypadku chorych dorosłych obciążonych chorobą nowotworową, stan nadkrzepliwości został udokumentowany badaniami laboratoryjnymi hemostazy i potwierdzony w licznych pracach, dotyczących najczęstszych nowotworów tj: raka piersi, raka pęcherzyka żółciowego, mięsaków tkanek miękkich, raka płuca czy czerniaka (83, 84, 85, 86, 87). W moich badaniach stwierdziłem, że w grupie chorych z niepomyślną odpowiedzią na leczenie, w chwili pierwotnej diagnozy średnia wartość wskaźnika protrombinowego była wyższa, niż w grupie wyleczonych, choć w obu grupach średnie

wartości pozostawały w normie. Ta obserwacja wskazuje na wpływ procesu nowotworowego na zewnątrzpochodną (czynnik VII oraz TF) i wspólną część (czynniki X, V, II) kaskady krzepnięcia. Nie stwierdzono aktywacji wewnątrzpochodnej drogi hemostazy (czynniki krzepnięcia XII, XI, IX, VIII), gdyż wartości czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji pozostawały w trakcie badań niezmiennie. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w guzach litych u dzieci w chwili diagnozy nowotworu przeważają procesy prozakrzepowe, w efekcie pobudzenia zewnątrzpochodnej drogi kaskady krzepnięcia. Stężenie antytrombiny III jako markera fibrynolizy ustrojowej, nie podlegało zmianom w grupie badanej przed i po terapii. Sugeruje to, że w wieku dziecięcym, nowotwory nie wywodzące się z układu krwiotwórczego, nie wpływają w sposób zasadniczy na procesy fibrynolizy.

Wyniki badań przedstawione w obecnej pracy wykazały pozytywny wpływ terapii onkologicznej na normalizację układu hemostazy. W przypadku chorych z rozpoznaniem nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, u których stwierdzano w momencie diagnozy stan nadkrzepliwości, z wysokimi wartościami wskaźnika protrombinowego oraz podwyższonego stężenia fibrynogenu, zauważono że terapia onkologiczna spowodowała obniżenie i normalizację tych parametrów. W przypadku chorych z rozpoznaniem wątrobiaka zarodkowego stwierdzono w chwili diagnozy najniższe wartości stężeń fibrynogenu w porównaniu z grupami chorych o innym rozpoznaniu, co można tłumaczyć uszkodzeniem miąższu wątroby przez rozrost nowotworowy i zmniejszeniem zdolności syntezy tego białka przez wątrobę. Najwyższe wartości płytek krwi wystąpiły w grupie chorych z wątrobiakiem zarodkowym, co jest następstwem nadmiernej produkcji trombopoetyny przez złośliwe guzy wątroby (88, 89). Jednocześnie u pacjentów z rozpoznaniem wątrobiaka zarodkowego, stwierdzono wzrost wartości wskaźnika protrombinowego, mimo niskich wartości fibrynogenu, co może dodatkowo wskazywać na aktywność prozakrzepową tego nowotworu. Te obserwacje potwierdzają sugerowany w piśmiennictwie możliwy wpływ na czynniki układu krzepnięcia, mechanizmów związanych bezpośrednio z rozwojem nowotworów OUN i wątroby. W przeciwieństwie do wątrobiaka zarodkowego i guzów OUN, w przypadku chorych z guzem Wilms'a, guzami kości oraz chłoniakiem Hodgkina, stwierdzano w chwili diagnozy wyższe średnie wartości fibrynogenu oraz niższe poziomy wskaźnika protrombinowego w porównaniu ze średnimi wartościami tych parametrów dla całej grupy badanej. W następstwie terapii wartości fibrynogenu ulegały obniżeniu, a wskaźnik protrombinowy podwyższeniu. W przypadku chorych z nowotworami pochodzenia mezenchymalnego, średnie wartości fibrynogenu pozostawały podwyższone ponad normę,

również po leczeniu onkologicznym. Fibrynogen, w pozostałych grupach chorych, z innymi niż mezenchymalne typami nowotworów, ulegał obniżeniu i normalizacji. W dotychczasowych publikacjach naukowych nie odnaleziono podobnych obserwacji dotyczących nowotworów dziecięcych.

Z przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wynika, że wznowa procesu nowotworowego w badanej populacji dziecięcej również wpływa na układ hemostazy, generując ponownie stan prozakrzepowy. W momencie rozpoznania wznowy choroby nowotworowej u badanych chorych zaobserwowano że, średnie stężenie fibrynogenu oraz D-dimeru było wyższe, niż podczas pierwotnego rozpoznania nowotworowego. Również średnia wartość wskaźnika protrombinowego była wyższa w momencie rozpoznania wznowy, niż podczas pierwotnej choroby. W wyniku terapii nowotworowej wartości zarówno fibrynogenu jak i D-dimeru ulegały obniżeniu, ale wartości średnie w grupie chorych ze wznową po leczeniu były wyższe, niż w grupie chorych z pierwotnym zachorowaniem. Terapia wznowy powodowała obniżenie średnich wartości wskaźnika protrombinowego. Te obserwacje wskazują, że we wznowie nowotworu u dzieci dochodzi do większego, niż w pierwotnym wzroście nowotworu, pobudzenia aktywności prozakrzepowej. Można przypuszczać, że wyższe wartości wskaźnika protrombinowego mogą wynikać z aktywności czynnika tkankowego. Tego typu przypuszczenia wymagają jednak dalszych szczegółowych badań. Podobne wyniki parametrów hemostazy, jak u pacjentów ze wznową, uzyskano także w przypadku chorych z nowotworem w stadium rozsiałym. W grupie dzieci z zaawansowaną, rozsianą chorobą nowotworową, także stwierdzono wysokie wartości INR, D-dimeru i fibrynogenu. Były one wyższe, niż w grupie z chorobą zlokalizowaną. Stwierdzono korzystny wpływ terapii onkologicznej na ich obniżenie. Badania Raj SD i wsp. (90) wykazały, że wartość D-dimeru jest niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia chorych dorosłych z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich, niezależnie od stopnia zaawansowania. Udowodniono też, że w postaci rozsianej tego typu nowotworu do mózgowia, stwierdza się stan nadaktywności układu hemostazy, nawet w przypadkach gdy w wyniku terapii onkologicznej nie występują już aktywne ogniska nowotworowe w pierwotnej lokalizacji (91). Wyniki przedstawianych przeze mnie badań wskazują, że także w badanej grupie dzieci z chorobą nowotworową parametry laboratoryjne układu krzepnięcia mogły mieć znaczenie predykcyjne. Wartości wskaźnika protrombinowego, stężenie D-dimeru i fibrynogenu w chwili diagnozy nowotworu w grupie dzieci, które podczas dalszej obserwacji zmarły z powodu choroby nowotworowej, były znamienne wyższe, w porównaniu do pacjentów

pozytywnie odpowiadających na leczenie. To spostrzeżenie potwierdziło także porównanie wartości INR, która w chwili diagnozy również była znamienne niższa w grupie o niekorzystnej odpowiedzi na leczenie. Interesujące spostrzeżenia dotyczą także, wartości stężenia antytrombiny III, podstawowej składowej układu fibrynolizy. W grupie z niekorzystną odpowiedzią na leczenie, wartość antytrombiny III malała w następstwie terapii, a w grupie chorych którzy osiągnęli całkowitą remisję, stężenie antytrombiny III wzrastało. Obniżanie wartości AT III w grupie o niepomyślnym przebiegu choroby, wskazuje nie tylko na wzrost aktywności prozakrzepowej, lecz także na zaburzenia równowagi procesu fibrynolizy i procesów zakrzepowych w ustroju. O dominującej roli zewnątrzpochodnej drogi kaskady krzepnięcia w chorobie nowotworowej u dzieci, świadczy brak odchyleń w czasie częściowej trombotoplastyny po aktywacji (APTT) we wszystkich przeprowadzonych w tej pracy badaniach.

2. Stężenie czynnika tkankowego w surowicy krwi.

Czynnik tkankowy (TF) jest głównym aktywatorem toru zewnętrznego kaskady krzepnięcia. Badania dowodzą, że uwalnianie do krwi czynnika tkankowego jest stymulowane cytokinami prozapalnymi i jego stężenie w surowicy krwi ulega wzrostowi w takich jednostkach chorobowych jak: zawał serca, udar mózgu, zakrzepica naczyń, posocznica oraz cukrzyca (6). W stanach zdrowia stężenie TF w osoczu ludzi dorosłych wynosi około 149 – 172pg/ml (6). Inne publikacje podają stężenia TF wahające się od 61 ± 59 pg/ml do $187,3 \pm 103,7$ pg/ml. Najczęściej powtarzają się wartości około 140 pg/ml z rozrzutem 18—290 pg/ml (91, 92). TF jest uznawany także, jako główny biologiczny marker zmian dokonujących się w hemostazie człowieka w przebiegu choroby nowotworowej (93, 94). W przypadku wielu chorób nowotworowych wieku dorosłego czynnik tkankowy jest produkowany przez tkankę nowotworową, co udowodniły badania przeprowadzane w nowotworach takich jak rak płuca, trzustki (95). Uważa się, że zwiększenie uwalniania TF przez nowotwór, jest następstwem kancerogennych mutacji genów, oddziaływaniem czynników produkowanych przez nowotwór na podścielisko oraz niedotlenieniem (46). Udowodniony został udział tego czynnika w powstawaniu, przebiegu i progresji nowotworu poprzez działanie modulujące procesy wewnątrzkomórkowe oraz wpływ na procesy wzrostu nowotworu, angiogenezy i tworzenia przerzutów zarówno w nowotworach u dorosłych (rak piersi, jelita grubego) jak również w niektórych nowotworach u dzieci (np. retinoblastoma) (6, 46, 48, 50, 96). W populacji ludzi dorosłych z rozpoznaniem choroby nowotworowej stwierdzono występowanie podwyższonych stężeń TF w surowicy. Potwierdza to rolę

czynnika tkankowego w rozwoju tego nowotworu. (22, 49, 52). Czynniki te odgrywa istotną niehemostatyczną rolę w pobudzaniu procesów biologicznych nowotworu takich jak: regulacja aktywności funkcji białek kontaktu, zmiana białek cytoszkieletu, migracja, proliferacja, apoptoza komórek, uruchomienie i pobudzenie reakcji zapalnej. Ponadto ingerencja TF w wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne wpływa na wzrost guza i tworzenie przerzutów (4, 6, 46, 48, 50, 97). Zwiększenie ekspresji czynnika tkankowego jest następstwem transformacji nowotworowych oraz wtórnego pobudzenia aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych (np. układ kinazy MAP, białka sygnałowe K-ras) lub mutacji inaktywujących białko supresorowe p53 (98). Występowanie zwiększonych wartości TF może być następstwem nadekspresji zmutowanego receptora czynnika wzrostu jak ma to miejsce w złośliwych glejakach mózgu i naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) (99). Znaczenie czynnika tkankowego w nowotworach dziecięcych nie zostało dotychczas jednoznacznie określone (prace Song i Schiavetti 81, 82, 96). Stąd też w mojej pracy, opierając się na dotychczasowych publikacjach i wynikach badań, w których wykazano nadmierną aktywność zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia, wyrażonej wzrostem wartości fibrynogenu i D-dimeru, podjąłem próbę określenia stężenia czynnika tkankowego w surowicy krwi oraz w tkance nowotworowej w badanej grupie chorych dzieci z nowotworami. Stężenie tego czynnika w chwili diagnozy było zróżnicowane i wahało się od 0,4pg/ml do 133,3pg/ml, co jest zgodne z danymi dotyczącymi stężeń TF w populacji ludzi dorosłych. Zaobserwowano różnice w stężeniu czynnika tkankowego w zależności od rozpoznania histopatologicznego. Najwyższą średnią wartości TF w momencie diagnozy stwierdzono u chorych z rozpoznaniem guzów pochodzenia embrionalnego: guzy Wilms'a, zwojaki zarodkowe współczulne, wątrobiaki zarodkowe i guzy germinalne. U tych pacjentów po leczeniu onkologicznym wartość TF wzrosła w porównaniu z jego stężeniem w chwili diagnozy. Obserwacja ta wymaga dalszych badań i poszukiwania przyczyn tego zjawiska. Nowotwory dziecięce rozwijające się z przetrwałej tkanki płodowej charakteryzują się dużą dynamiką wzrostu, z krótkim czasem podwojenia masy nowotworu, co wpływa na wysoki odsetek pacjentów w zaawansowanym, rozsiałym stadium nowotworu w chwili diagnozy. W grupie 23 chorych z nowotworami zarodkowymi, w której zmierzono stężenie TF w surowicy, aż połowę (11) stanowili pacjenci z obecnością przerzutów odległych. Agresywność dziecięcych nowotworów może być przyczyną wysokich wartości TF już w chwili diagnozy onkologicznej, ale w dostępnym piśmiennictwie nie odnaleziono potwierdzenia dla tego przypuszczenia. Nowotwory pochodzenia zarodkowego u dzieci, mimo znacznej dynamiki wzrostu, charakteryzują się dobrym rokowaniem, z wysokim

odsetkiem wyleczeń, ze względu na ich znaczną chemiowrażliwość. W badanej grupie 23 dzieci z guzami zarodkowymi, progresję prowadzącą do zgonu, stwierdzono tylko u trojga pacjentów. Pozostali (19 chorych) osiągnęli całkowitą remisję. Przyczyna utrzymywania się wysokich wartości TF u tych chorych wymaga dalszego wyjaśnienia. Być może kontrolne, odległe w czasie od zakończonego leczenia, badania czynnika TF w tej grupie chorych, przybliżyłyby odpowiedź na to pytanie. Wzrost średnich stężeń TF po leczeniu onkologicznym I linii zaobserwowano w grupie dzieci z nowotworami OUN. W tej grupie główną tego przyczyną mógł być niekorzystny przebieg choroby z progresją choroby u czterech pacjentów. Obserwacja ta jest zbieżna z danymi w publikacjach dotyczących guzów OUN u dorosłych (100). Wysoka wartość TF w chwili diagnozy, została stwierdzona także w grupie dzieci ze złośliwym mięsakami. Pośród 19 pacjentów z rozpoznaniem mięsaka tkanek miękkich, u większości (10 chorych) choroba była pierwotnie rozsiana, z obserwowaną następnie niekorzystną odpowiedzią na leczenie. Wszyscy chorzy w IV stadium klinicznym zmarli z powodu progresji choroby. Można przypuszczać, że wysoki odsetek progresji stał się przyczyną, utrzymywania się wysokich średnich stężeń TF po zastosowaniu terapii. Wśród pacjentów z mięsakami, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie osiągając całkowitą remisję, wartość TF ulegała zdecydowanemu obniżeniu. W grupie chorych z rozpoznaniem chłoniaka Hodgkina stężenia czynnika tkankowego również uległy zdecydowanemu obniżeniu w następstwie terapii. Wszyscy badani pacjenci tej grupy bardzo dobrze i w krótkim czasie odpowiedzieli na leczenie, uzyskując całkowitą remisję choroby. Być może wpływ na obniżenie się TF w tej grupie chorych miał, rodzaj stosowanej terapii, która różniła się od leczenia guzów litych, m.in. zastosowaniem sterydoterapii. Jak wiadomo z piśmiennictwa sterydy poprzez działanie m.in. przeciwzapalne powodują obniżenie cytokin prozapalnych, co może w konsekwencji wpływać na obniżenie poziomu TF w surowicy. Powyższe wyniki wymagają dalszych poszerzonych badań i ze względu na zróżnicowany materiał (różne rozpoznania histopatologiczne) stanowią jedynie wstępną obserwację. Wysokie wartości stężeń TF, utrzymujące się pomimo leczenia skłania do podjęcia dalszych badań z monitorowaniem stężeń TF w dłuższym przedziale czasowym. W przypadku pacjentów w wieku rozwojowym z rozpoznaniem nowotworów MTM i HD, stężenia czynnika tkankowego w surowicy obniżyły się po zastosowanym leczeniu, u dzieci które osiągnęły całkowitą remisję. Jednocześnie w przypadku tych rozpoznań, stwierdzono utrzymywanie się wysokiego stężeń TF po zastosowanej terapii w grupie pacjentów o złym rokowaniu. Te obserwacje są zgodne z opisami dla tych samych nowotworów, ale

występujących u dorosłych i wstępnie wskazuje na rolę TF nie tylko w rozwoju nowotworu, lecz również jako czynnika prognozy (46, 47, 101).

W pracy podjąłem próbę określenia znaczenia prognostycznego TF, poprzez analizę stężenia TF w przypadku wznowy i progresji nowotworu wieku dziecięcego. Na uzyskane wyniki duży wpływ wywarła grupa chorych z nowotworami zarodkowymi, gdzie stwierdzono utrzymywanie się wysokich średnich wartości TF również po uzyskaniu całkowitej remisji choroby. Dlatego uzyskane wartości TF interpretowano metodą pośrednią, oszacowując głębokość zachodzących zmian. Stwierdzono, że w przypadku wznowy nowotworu, po leczeniu utrzymują się wyższe wartości stężenia TF, niż po leczeniu pierwotnego zachorowania. Również uogólniona choroba, czy progresja nowotworu wiązały się z wyższymi wartościami stężeń TF po zastosowanym leczeniu. Po wyłączeniu z analizy grupy chorych z nowotworami zarodkowymi, wyższe stężenia TF w surowicy po leczeniu, korelują z niekorzystnym przebiegiem choroby. Natomiast w przypadkach korzystnej odpowiedzi na leczenie i osiągnięciu całkowitej remisji, wartość TF ulegała dużemu obniżeniu. Wyniki wskazują, że klinicznie niekorzystne czynniki prognozy w chorobie nowotworowej u dzieci, jak: obecność przerzutów, wznowa, progresja, związane są z wyższymi wartościami czynnika tkankowego. Obserwacja ta w sposób pośredni może wskazywać na znaczenie TF jako czynnika prognostycznego i jego rolę w rozwoju choroby nowotworowej u dzieci. Tego typu obserwacje wielokrotnie przedstawiano w różnych typach nowotworów u dorosłych (46, 47, 51, 102).

3. Wskaźniki układu krzepnięcia w tkankach nowotworowych.

W koagulologicznej analizie immunohistochemicznej tkanki nowotworowej posłużono się antygenami odgrywającymi istotną rolę w hemostazie. Czynn timer tkankowy, który jest prekursorem drogi zewnątrzpochodnej krzepnięcia, antytrombina III, będąca podstawowym czynnikiem układu fibrynolizy, zaś antygen CD 31 i czynnik krzepnięcia VIII posłużyły jako markery ściany naczyniowej. Badania immunohistochemiczne dotyczące wybranych czynników związanych z hemostazą przeprowadzono w małej grupie chorych (26 pacjentów). Oznaczenie ekspresji czynn timer TF, czynn timer VIII i antytrombiny III w tkance nowotworowej, pozwala jedynie na wstępne podsumowanie tych analiz. Wykazanie ekspresji czynn timer tkankowego o różnym nasileniu w komórkach nowotworów wieku dziecięcego, potwierdza udział tego czynn timer w procesie nowotworowym. Szczególnie wysoką ekspresję komórkową TF zaobserwowano w części przypadków guzów pochodzenia zarodkowego

(zwojak zarodkowy współczulny i guz Wilms'a) oraz w mięsakach. W pozostałych badanych tkankach, ekspresja kształtowała się w zakresie odczynów słabych. Ekspresja TF w obrębie naczyń nowotworowych była słaba lub nieobecna w badanych guzach. Konieczne są dalsze badania stopnia ekspresji i występowania TF w tkance nowotworowej, w większej grupie nowotworów wieku rozwojowego. Inni autorzy w badaniach przeprowadzonych u dorosłych, w guzach pierwotnych i przerzutach, jak również w płynie torbieli guzów, czy w nowotworowych płynach wysiękowych, wykazali obecność TF, jak i pozostałych czynników krzepnięcia drogi zewnątrzpoходnej układu krzepnięcia (65, 99, 103).

Ekspresja czynnika krzepnięcia – VIII (FVIII), ujawniła się głównie w obrębie naczyń krwionośnych tkanek badanych guzów. Silna ekspresja tego czynnika w obrębie naczyń nowotworowych występowała w przypadku guzów o niskim stopniu zaawansowania klinicznego choroby. W chorobie rozsianej, w naczyniach guza przeważały odczyny o niskiej intensywności. Obniżenie ekspresji czynnika VIII w obrębie naczyń nowotworowych wraz z zaawansowaniem procesu nowotworowego, może być następstwem zmniejszenia śródbłonkowej syntezy czynnika VIII w dużych guzach nowotworowych. Może to wynikać ze znacznego niedotlenienia zarówno tkanek jak i ścian naczyń w obrębie guzów nowotworowych, lub wytwarzania czynników hamujących czynnik VIII. Ta obserwacja wymaga również potwierdzenia w dalszych badaniach, gdyż dotychczas w przypadku guzów dziecięcych tego typu obserwacje nie zostały opublikowane. W nowotworach u ludzi dorosłych (mięsaki, czerniak złośliwy) udowodniono, że w początkowej fazie choroby nowotworowej, szczególnie w postaciach zaawansowanych, dochodzi do stymulacji aktywności czynnika VIII do poziomów >150%, generujących powikłania zakrzepowe (104). W dotychczasowych opublikowanych pracach wykazano, że stymulacja angiogenezy poprzez śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF), oddziałując na śródbłonek, powoduje zwiększenie ekspresji czynnika VIII (105). Natomiast w stanach terminalnych choroby nowotworowej ujawniają się częściej powikłania krwotoczne, które tłumaczy się obniżeniem syntezy czynnika VIII w wątrobie, czy też uszkodzeniem toksycznym śródbłonka naczyniowego pod wpływem nowotworu. W przypadku niektórych nowotworów u dorosłych, najczęściej w chorobach limfoproliferacyjnych, raku płuca i prostaty, stwierdzono wraz z rozwojem nowotworu, obecność inhibitora dla czynnika VIII, którego powstanie jest stymulowane procesem nowotworowym (106, 107). Co więcej, wykazano, że obecność inhibitora tego czynnika prowadzi do wystąpienia nabytej hemofilii A, charakteryzującej się powikłaniami krwotocznymi. Uważa się, że choroba nowotworowa jest przyczyną 10% przypadków nabytej hemofilii A u dorosłych. (108). U dzieci natomiast nabyta hemofilia A

jest chorobą kazuistyczną (109). W piśmiennictwie odnaleziono jeden opis nabytego niedoboru VII czynnika krzepnięcia, z powodu obecności inhibitora tego czynnika w przebiegu choroby nowotworowej - guza Wilms'a u dziecka. W tym opisanym przypadku po przeprowadzeniu resekcji masy nowotworowej, uzyskano pełną normalizację czasu protrombinowego z ustąpieniem inhibitora czynnika (110). Opisano także przypadki występowania choroby nowotworowej u pacjentów obciążonych wrodzoną hemofilią (111, 112), mimo że niektórzy autorzy wskazują na ochronne, przeciwnowotworowe znaczenie wrodzonego niedoboru czynnika VIII u chorych z hemofilią. Udokumentowano niższy wskaźnik śmiertelności z powodu choroby nowotworowej (z wyłączeniem nowotworów związanych z zakażeniami wirusami HIV i HCV) u chorych na hemofilię (113). Obserwacje te potwierdzają rolę homeostazy układu krzepnięcia w kancerogenezie.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały również ekspresję głównego czynnika fibrynolizy - antytrombiny III w komórkach nowotworowych, szczególnie nasiloną w guzach zarodkowych i mięsakach. Warte podkreślenia jest stwierdzenie bardzo silnej ekspresji antygeny AT III w licznych (60-100%) komórkach guza Wilms'a o utkaniu nabłonkowym i mezenchymalnym, z przewagą w elementach nabłonkowych. W analizowanym materiale bibliograficznym nie znaleziono żadnych informacji dotyczących tej obserwacji. W pozostałych badanych guzach typu dziecięcego ekspresja AT III w komórkach nowotworowych nie była tak intensywna, jak w przypadku guzów Wilms'a, choć była ona wyraźnie zauważalna. Podejmując wstępną próbę interpretacji znacznej ekspresji AT III w tkankach guza Wilms'a, należy zauważyć, że tkanki tego nowotworu są poddawane badaniom histopatologicznym, jak również immunohistochemicznym, po przeprowadzonej przedoperacyjnie wstępnej chemioterapii. Zgodnie z przyjętym w Polsce protokołem SIOP (Societe International d'Oncologie Pediatrique) w wersji z 2001 roku, wstępne leczenie onkologiczne guza Wilms'a rozpoczyna się, jedynie w oparciu o badania radiologiczne, bez diagnozy patomorfologicznej (57). Obserwowana wysoka ekspresja AT III w tkankach guza Wilms'a, może być wynikiem wpływu wcześniej przeprowadzonej chemioterapii na nowotwór. Porównanie grupy guzów Wilms'a przed leczeniem chemicznym i po wstępnej chemioterapii, pozwoliłoby ocenić wpływ leczenia na ekspresję AT III w tkance nowotworowej. Przeprowadzenie badań porównujących ekspresję AT III w guzach Wilms'a przed wstępną chemioterapią, jest możliwe w Polsce jedynie w odniesieniu do przypadków okołourazowej nefrektomii z guzem. Utkanie nabłonkowo-mezenchymalne guza Wilms'a to, najczęściej występująca postać guza Wilms'a u dzieci, która kwalifikuje chorego do grupy

pośredniego ryzyka. W ocenianej grupie guzów Wilms'a, był tylko jeden przypadek o innej budowie histopatologicznej z dominującą komponentą mezenchymalną, a ekspresja AT III w tym guzie nie występowała. Nerczak płodowy o budowie nabłonkowo-mezenchymalnej, jest nowotworem o korzystnym rokowaniu. Osiągane wyniki leczenia chorych z tą postacią histologiczną guza Wilms'a są bardzo dobre, gdyż wyleczenia dotyczą ponad 90% chorych (114). Ostateczne wyjaśnienie znaczenia silnej ekspresji AT III występującej w komórkach nerczaka płodowego i jej wpływu dla przebiegu klinicznego tego nowotworu, wymaga dalszych badań.

4. Podsumowanie

Proces rozwoju nowotworu u dzieci wywiera wpływ na funkcjonowanie układu krzepnięcia, na co wskazują wyniki przeprowadzonych w tej populacji badań. Płytki krwi spełniają zasadniczą rolę w procesie krzepnięcia. W przeprowadzonych badaniach dzieci z nowotworami, nie wywodzącymi się z układu krwiotwórczego, stwierdzono prawidłową, w granicach normy, liczbę płytek krwi w chwili diagnozy choroby. Wykazano jednak różnice w średnich wartościach liczby płytek między grupą pacjentów dobrze odpowiadających na leczenie i grupą o niekorzystnym przebiegu klinicznym. Udowodniono, że w przypadku niekorzystnego przebiegu choroby – wznowa, progresja, średnie wartości płytek krwi w chwili diagnozy były niższe, niż w przypadku chorych, którzy w wyniku leczenia osiągnęli całkowitą remisję. Badania w niniejszej pracy wskazały dodatkowo, że w przypadku zaawansowanej, rozsianej postaci choroby nowotworowej liczba płytek była znamienne wyższa, niż w postaci zlokalizowanej. Ponadto stwierdzono, że średnie wartości płytek krwi, w chwili diagnozy, różnią się w zależności od rozpoznania typu nowotworu. Rzeczywistą wartość tej obserwacji i ewentualną ocenę wartości prognostycznej tego parametru, może zostać ustalona w dalszych rozszerzonych badaniach. W badaniach koagulologicznych wykazano aktywację drogi zewnątrzpoходnej kaskady krzepnięcia w chwili rozpoznania nowotworu, na co wskazują nieprawidłowe wartości wskaźnika protrombinowego i jego pochodnej – wskaźnika INR, przy prawidłowych wartościach czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) stwierdzane w chwili diagnozy nowotworu. Konsekwencją pobudzenia zewnątrzpoходnej drogi krzepnięcia jest indukcja stanu prozakrzepowego, czego wykładnikami w przeprowadzonych badaniach były stwierdzane wysokie wartości fibrynogenu i D-dimeru. W przypadkach nowotworów o niekorzystnym klinicznie przebiegu (przerzuty, progresja, wznowa) zaobserwowano nasilenie się aktywności prozakrzepowej ujawniającej się pod postacią zmian stężenia D-dimeru, fibrynogenu w

surowicy oraz wskaźnika protrombinowego. W przypadkach progresji nowotworu wykazano, oprócz wyżej wymienionych zaburzeń, dodatkowo zahamowanie układu fibrynolitycznego (obniżenie stężenia AT III), co pogłębiało zaburzenia równowagi hemostatycznej w kierunku prozakrzepowym. Utrzymywanie się nieprawidłowych wartości tych parametrów hemostazy może mieć znaczenie prognostyczne. Uzyskiwana całkowita remisja choroby po terapii onkologicznej powodowała korzystne zmiany w kierunku normalizacji tych parametrów krzepnięcia. Obserwacje te wskazują, że stopień zaburzeń hemostazy związany z rozwojem nowotworu, może mieć znaczenie prognostyczne. Wymaga to potwierdzenia w badaniach na większej grupie chorych. Zaobserwowano różnice w badanych wykładnikach stanu hemostazy u chorych, w zależności od typu histopatologicznego rozpoznanego u nich nowotworu. Należy jednak pamiętać, że typ histologiczny nowotworu determinował również pozytywną lub negatywną odpowiedź na leczenie. W grupie chorych z nowotworami OUN wartość wskaźnika protrombinowego malała w trakcie leczenia, zaś rosła w grupie chorych z chłoniakiem Hodgkina i mięsakami. W odniesieniu do wartości fibrynogenu, stwierdzono obniżanie się jego stężenia po leczeniu onkologicznym we wszystkich grupach rozpoznań, za wyjątkiem mięsaków, gdzie wartość ta utrzymywała się na niezmiennym, wysokim poziomie jak w chwili diagnozy.

Zmiany parametrów układu krzepnięcia u dzieci z niektórymi chorobami nowotworowymi mogą wynikać z produkcji czynnika tkankowego przez nowotwór. W przypadkach chorych z guzami ośrodkowego układu nerwowego, mięsakami i chłoniakami Hodgkina, wartości TF obniżały się po uzyskaniu całkowitej remisji po leczeniu. Natomiast wzrost poziomu TF w tych nowotworach, pomimo terapii onkologicznej, obserwowano u chorych, u których wystąpiły niekorzystne zdarzenia związane z nowotworem: przerzuty, wznowa lub progresja. Obserwacja ta wskazuje na progresywny udział TF wraz z rozwojem części nowotworów wieku dziecięcego. Nie dotyczy to guzów pochodzenia zarodkowego. W nowotworach pochodzenia zarodkowego stwierdzono wysokie wartości TF w surowicy, w chwili diagnozy. Pomimo wysokich współczynników wyleczalności tych nowotworów, stężenie TF rośnie w następstwie terapii i jest najwyższe po uzyskaniu remisji choroby. Dla wyjaśnienia przyczyny tej obserwacji, potrzeba dalszych, poszerzonych długofalowych badań.

Badania aktywności TF w tkankach nowotworowych wprawdzie potwierdziły aktywność tego czynnika w komórkach, ale intensywność ekspresji TF była zróżnicowana, co nie pozwala na wiążące wnioski. Stwierdzono również w pewnych typach histologicznych

wysoką aktywność antytrombiny III. Szczególnie wysoką ekspresję AT III wykazano w komórkach nowotworowych guza Wilms'a o utkaniu nabłonkowo-mezenchymalnym. Badania aktywności czynnika VIII ujawniły jego obecność głównie w naczyniach nowotworowych. Wysoką jego aktywność w naczyniach nowotworowych zaobserwowano w postaciach zlokalizowanych nowotworu, zaś w postaciach uogólnionych jego aktywność była zdecydowanie mniejsza.

Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ rozwoju nowotworu na wybrane czynniki układu hemostazy w chorobie nowotworowej u dzieci. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano nowe dotychczas nie publikowane obserwacje, które wymagają potwierdzenia w dalszych, poszerzonych i wieloośrodkowych badaniach. Dalsze badania mogą wyjaśnić i określić udział zaobserwowanych zmian w procesie rozwoju nowotworu oraz ocenić ich przydatność jako wskaźników prognostycznych. Mogą też przyczynić się do rozwoju nowych możliwości terapeutycznych w nowotworach dziecięcych.

Wnioski

- 1. W badanej grupie nowotworów dziecięcych występuje zwiększona aktywność zewnątrzpoходnej drogi krzepnięcia.**
- 2. Wpływ terapii przeciwnowotworowej na stan hemostazy zależy od typu histologicznego nowotworu.**
- 3. Wstępnie podwyższone stężenie czynnika tkankowego w surowicy krwi koreluje z niekorzystnym przebiegiem klinicznym choroby nowotworowej (obecność przerzutów, progresja choroby).**
- 4. Wstępne, w chwili rozpoznania niektóre parametry krzepnięcia w surowicy krwi, takie jak: wartość wskaźnika protrombinowego, fibrynogenu, D-dimeru, mogą mieć znaczenie prognostyczne, lecz wymaga to potwierdzenia badaniami na większej grupie chorych.**
- 5. Ekspresja czynnika tkankowego w komórkach nowotworów dziecięcych jest zróżnicowana i zależy od typu choroby nowotworowej.**
- 6. Ekspresja czynnika krzepnięcia VIII w nowotworach dziecięcych występuje głównie w obrębie naczyń i jest wyższa w postaciach zlokalizowanych, niż w postaciach rozsiaanych.**

Streszczenie

Układ krzepnięcia warunkuje utrzymanie płynności przez krążącą krew, a w sytuacji uszkodzenia ściany układu naczyniowego zabezpiecza jego spójność, wytwarzając skrzep. Nieprawidłowości w procesie hemostazy warunkują wystąpienie ciężkich powikłań o charakterze zakrzepowo-zatorowym lub krwotocznym. W przebiegu choroby nowotworowej ilość i nasilenie tych powikłań jest duża, co wynika z sumowania się wielu czynników ryzyka związanych z chorobą i jej leczeniem. Aktywacja kaskady krzepnięcia i innych mechanizmów hemostatycznych jest procesem koniecznym dla procesu wzrostu guza nowotworowego i tworzenia przerzutów. Kluczową rolę w procesach karcynogenezy odgrywa czynnik tkankowy (TF), inicjator zewnętrznego toru kaskady krzepnięcia. TF modulując procesy wewnątrzkomórkowe wpływa na migrację i proliferację komórek, hamuje apoptozę, aktywuje śródbłonek naczyniowy, stymuluje angiogenezę powodując wzrost guza i jego krwiopochodny rozsiew.

Choroba nowotworowa wieku dziecięcego to choroba rzadko występująca, ale charakteryzująca się wysoką agresywnością. Nowotwór rozwija się szybko, a duży odsetek chorych w czasie diagnozy znajduje się w fazie uogólnionej choroby. Mechanizmy uczestniczące w procesie nowotworzenia u dzieci wciąż pozostają nieznane.

Celem pracy była ocena stanu układu krzepnięcia w zależności od parametrów klinicznych oraz typu histologicznego wybranych nowotworów wieku rozwojowego. W tym celu zmierzono przed i po leczeniu przeciwnowotworowym wartości podstawowych parametrów laboratoryjnych układu krzepnięcia: płytki krwi, czas protrombinowy, czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, D-dimer, fibrynogen, antytrombina III oraz stężenie TF i porównano z wybranymi parametrami klinicznymi choroby. Dokonano oceny ekspresji czynników krzepnięcia: antytrombiny III, czynnika tkankowego, czynnika VIII oraz antygenu CD31 w tkance nowotworowej: komórkach i naczyniach nowotworowych.

Badaniami objęto 86 dzieci leczonych w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w latach 2008-2014r z powodu rozpoznania choroby nowotworowej. Chorych podzielono na cztery podgrupy rozpoznania: nowotwory pochodzenia zarodkowego (zwojak współczulny zarodkowy, nerczak zarodkowy, nowotwory germinalne, wątrobiak zarodkowy), nowotwory tkanek miękkich i kości, chłoniak Hodgkina, nowotwory centralnego układu nerwowego.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że średnie wartości płytek krwi, wskaźnika protrombinowego, fibrynogenu oraz TF w ustalonych podgrupach chorych według

rozpoznań histologicznych różniły się znamienne statystycznie. W przypadku diagnozy wznowy nowotworu stwierdzono znamienne wyższe stężenia fibrynogenu i D-dimeru. U chorych z uogólnioną postacią choroby nowotworowej wykazano znamienne wyższą średnią liczbę płytek krwi, TF i INR, niż w stadium zlokalizowanym. Istotne obniżenie średniej wartości fibrynogenu i D-dimeru po leczeniu przeciwnowotworowym było niezależne od stadium zaawansowania choroby nowotworowej. U chorych z niepomyślnym przebiegiem choroby nowotworowej stwierdzono w chwili diagnozy niższe średnie wartości płytek krwi i INR. Wartości D-dimerów, fibrynogenu w momencie rozpoznania progresji nowotworu były wyższe, niż u chorych którzy uzyskali całkowitą remisję. Badaniami immunohistochemicznymi stwierdzono największą ekspresję antytrombiny III w komórkach nowotworowych występującą w postaci epitelialno-mezenchymalnej guza Wilms'a i jest ona znamienne wyższa, niż w grupie pozostałych badanych nowotworów. Jednocześnie stwierdzono statystyczną różnicę ekspresji antygenu FVIII w naczyniach tkanki nowotworowej między postaciami zlokalizowanymi - wyższą i rozsiały nowotworu - niską.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. W badanej grupie nowotworów dziecięcych występuje zwiększona aktywność zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia.
2. Wpływ terapii przeciwnowotworowej na stan hemostazy ustroju, zależy od typu histologicznego nowotworu.
3. Wyższe wartości czynnika tkankowego w surowicy krwi korelują z niekorzystnym przebiegiem klinicznym choroby nowotworowej (obecność przerzutów, progresja choroby).
4. Wstępne, w chwili rozpoznania parametry krzepnięcia w surowicy krwi, takie jak: wartość wskaźnika protrombinowego, fibrynogenu, D-dimeru, mogą mieć znaczenie prognostyczne, lecz wymaga to potwierdzenia badaniami na większej grupie chorych.
5. Ekspresja czynnika tkankowego w komórkach nowotworów dziecięcych jest zróżnicowana i zależy od typu choroby nowotworowej.
6. Ekspresja czynnika krzepnięcia VIII w nowotworach dziecięcych występuje głównie w obrębie naczyń i jest wyższa w postaciach zlokalizowanych, niż w postaciach rozsiały.

ABSTRACT

Coagulation system matters a lot for the maintenance of liquidity by circulating blood, and in the event of damage to the vascular walls secures its consistency, generating a clot. Irregularities in this process lead to instance of severe thromboembolic or haemorrhagic complications. In the course of cancer the number and intensity of these complications is high, due to the addition of multiple risk factors associated with the disease and its treatment. Activation of the coagulation cascade is necessary for the process of cancer growth and metastasis. An important role in this processes plays tissue factor (TF), the initiator of an extrinsic pathway of clotting cascade. TF by modulating intracellular processes, affects the migration and proliferation of cells, inhibits apoptosis, activates the vascular endothelium, stimulates angiogenesis, causing tumor growth and metastases.

Childhood cancer occurs rarely but with high aggressiveness disease. The cancer grows rapidly and a large percentage of patients have metastasis at the time of diagnosis of disease. The mechanisms, which plays rules in the process of malignancy in children, still remain unknown.

The aim of this work was to value the state of coagulation system according to the parameters of the clinicopathological characteristic in patients with children and youth types of cancers. The value of the basic laboratory parameters of the coagulation: platelets, prothrombin time, partial thromboplastin time after activation, D-dimer, fibrinogen, antytrombina III and TF concentration have been measured before and after treatment. Then they have been compared with the selected clinical parameters of the disease. The expression of clotting factors: antithrombin III, tissue factor, factor VIII antigen and tissue antigen CD31 have been measured in the cells and blood vessels.

The studies have covered 86 children who were treated in the Department of Pediatrics, Hematology and Oncology, Medical University of Gdańsk in 2008-2014 due to the diagnosis of cancer. Patients were divided into four subgroups: the embryological origin of cancer (neuroblastoma, germ cell tumors, Wilms' tumor, hepatoblastoma), soft tissue and bone tumors, Hodgkin's lymphoma, a cancer of the central nervous system.

On the basis of the performed study, there has been found that the average value of platelets, prothrombin index, fibrinogen and TF was significantly statistically different in the subgroups of patients according to the histological diagnoses. In the case of diagnosis of recurrence of cancer there has been found significantly higher concentrations of fibrinogen and D-dimer. In patients with a metastatic form of cancer there has been shown to

significantly higher average number of platelets, TF and INR than located stadium. Significant reduction of the average value of fibrinogen and D-dimer after treatment has been independent of the stage of malignancy. In patients with adverse course of malignancy there has been found lower average value of platelets and INR at the time of diagnosis. The value of D-dimer, fibrinogen at diagnosis of cancer progression, have been higher than in patients with complete remission. Immunohistochemical research has shown the highest expression of antithrombin III in cancer cells in the epithelio-mesenchymal Wilms' tumor and it has been significantly higher than in the rest of the studied group. There has been found a statistical higher expression of FVIII antigen in tumor vessels in located stage than in scattered cancer.

On the basis of studies the following conclusions have been carried out :

1. There is increased activity of extrinsic pathway of clotting in the researching children's cancers.
2. Anticancer therapy effects on the coagulation system and depends on the histological type of malignancy.
3. Higher serum tissue factor values correlate with adverse course of clinical cancer (the presence of metastases, the progression of the disease).
4. Initial values of coagulation parameters, such as prothrombin index, fibrinogen, D-dimer, may have prognostic importance, but this conclusion requires the next tests on a larger group of patients.
5. Expression of tissue factor in children's cancer cells is differentiated and depends on the type of cancer.
6. Expression of clotting factor VIII in childhood cancer occurs mostly in the blood vessels and it is higher in the localized forms, than scattered.

Piśmiennictwo:

1. Nowak W, Skotnicki A. Podstawy Hematologii. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2011.
2. Sokołowska B. Nowa koncepcja kaskady krzepnięcia krwi. Zamojskie Studia i Materiały 2011;1:59-64.
3. Sarnaik A, Kamat D, Kannikeswaran N. Diagnosis and management of bleeding disorder in a child. N. Clin Pediatr. 2010;49:422-431.
4. Goodsell DS. The molecular perspective: Tissue Factor. Oncologist. 2006;11:849-850.
5. Antczak A, Myśliwiec M, Pruszczyk P, Dmoszyńska A. Wielka Interna. Hematologia Medical Tribune Polska, Warszawa 2011.
6. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis and vascular development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1015-1022.
7. Interna Szczeklika. Podręcznik chorób wewnętrznych 2013. Red. Piotr Gajewski. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2013.
8. Revel-Vilk S, Yacobovich J, Tamary H, et al. Risk factors for central venous catheter thrombotic complications in children and adolescents with cancer. Cancer. 2010;116:4197-205.
9. Nowak-Gottl U, Junker R, Krenz W et al. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factor. Blood 2001;97:858-862.
10. Smalisz-Skrzypczyk K, Klukowska A, Pawelec K, Matysiak M. Analiza przyczyn zmian zakrzepowo-zatorowych u dzieci. Postępy Nauk Medycznych. 2013;9:640-645.
11. David M, Manco-Johnson M, Andrew M. Diagnosis and treatment of venous thromboembolism in children and adolescent. On behalf of the Subcommittee on Perinatal Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Thromb Haemost. 1995;74:791.
12. Andrew M. Developmental hemostasis: relevance to thromboembolic complications in pediatric patients. Thromb Haemost. 1995;74:415.
13. Radoń-Proskura J, Malinowska A, Irga-Jaworska N. Standardy Medyczne Pediatria. 2014;4:410-417.
14. Gerotziafas GT. Risk factor for venous thromboembolism in children. Int Angiol. 2004;23:195-205.
15. Wells P.S et al. Thromb Haemost. 2000;83:416-420.
16. Wells P.S et al. Lancet. 1997;350:1795-1798.
17. Galar M, Szumowska A, Kłoczko J. Inhibitory krzepnięcia krwi o działaniu antykoagulacyjnym w ostrych białaczkach. Acta Haematol Pol. 2011;42:193-200.

18. Podolak-Dawidziak M, Urbaniak-Kujda D, Kustrzycki W. Coagulation abnormalities in cancer. International Intensive Course in Oncology- ERASMUS'99. Wrocław, 3-17 September 1999; Wrocław: Akad.Med;1999:410-420.
19. Bick RL. Coagulation abnormalities in malignancy: a review. *Semin Thromb Hemost.* 1992;18:353
20. Athale U, Siciliano S, Thabane L, et al. Epidemiology and clinical risk factors predisposing to thromboembolism in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer*;51:792-797.
21. Athale U, Chan A. Thromboembolic complications in pediatric hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33:416-426.
22. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Clin Med Hotel Dieu Paris.* 1865;3:94.
23. Paz-Priel I, Long L, Helman L, et al. Thromboembolic events in children and young adults with pediatric sarcoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:1519-1524.
24. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor In cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res.* 2010;125:36-38.
25. Athale U. Thrombosis in pediatric cancer: identifying the risk factors to improve care. *Expert Rev Hematol.* 2013; 6: 599-609.
26. Halton J, Nagel K, Brandao LR, et al. Do children with central venous line (CVL) dysfunction have increased risk of symptomatic thromboembolism compared to those without CVL-dysfunction, while on cancer therapy? *Cancer.* 2012;12:314.
27. Athale U, Chan A. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res.* 2003;111:125-131.
28. Mitchel LG, Andrew M, Hanna K, 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. *Cancer.* 2003;97:508-516.
29. Piątkowska-Jakubas B, Krawczyk-Kuliś M, Giebel S i wsp. Stosowanie L-asparaginazy w leczeniu dorosłych chorych na ostrą białaczkę limfo blastyczną. Rekomendacje Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych. *Pol Arch Med.* Wewn 2008;118:664-669.
30. Hellman A, Hałaburda K. Choroba wenookluzyjna wątroby. *Acta Haematol Pol.* 2001;33:181-190.
31. Myśliwiec M. Mikroangiopatie zakrzepowe – postępy w patogenezie diagnostyce i leczeniu. *Nefrol Dial Pol* 2008;12:124-127.
32. Levine M, Kakkar AK. Catheter associated thrombosis: thromboprophylaxis or not? *J Clin Oncol* 2005;23:4006-4008.
33. Deitcher SR, Gajjar A, Kun L et al. Clinically evident venous thromboembolic events in children with brain tumors. *J Pediatr* 2004;145:848-850.

34. Athale U, Siciliano S, Cheng J et al. Central venous line dysfunction is an independent predictor of poor survival in children with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012;34:188-193.
35. Massicotte P, Mitchel L. Thromboprophylaxis of central venous lines in children with cancer: the first step taken on the long road ahead. *Acta Paediatr.* 2006;95:1049-1052.
36. Lee Y, Levine M, Butler G et al. Incidence, risk factors and outcome of catheter related thrombosis in adult patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:1404-1408.
37. Revel-Vilk S, Menahem M, Stoffer C et al. Post-thrombotic syndrome after central venous catheter removal in childhood cancer survivors is associated with a history of obstruction. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55:153-156.
38. Albisetti M, Kellenberger CJ, Bergstrasser E, et al. Port-a-cath-related thrombosis and postthrombotic syndrome in pediatric oncology patients. *J Pediatr.* 2013;163:1340-1346.
39. Nowak-Gottl U, Ahlke E, Fleischhack G et al. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BMF protocols). *Blood.* 2003;101:2529-2533.
40. Male C, Chait P, Andrew M et al. Central venous line-related thrombosis in children: association with central venous line location and insertion technique. *Blood.* 2003;101:4273-8.
41. Journeyake JM, Buchanan GR. Catheter-related deep venous thrombosis and other catheter complications in children with cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:4575-4580.
42. Andrew M, Michelson A, Bovill T, et al. The prevention and treatment of thromboembolic disease in children: a need for thrombophilia programs. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997;19:7-22.
43. Klukowska A i wsp. Raport z III konferencji "Innowacje w hemostazie". *J Transf Med.* 2010;3:68-87.
44. Rak J. Onkogeny jako modyfikatory procesów naczyniowych w nowotworach. *J Oncol.* 2006;56:57-79.
45. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Throm Hemost* 2004;30:31-44.
46. Van den Berg Y, Osanto S, Reitsma P, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood.* 2012;119:924-932.
47. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor In cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res.* 2012;125:35-38.
48. Vijaya Mohan Rao L, Pendurthi VR. Tissue Factor – Factor VII Signaling. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2005;25:47-56.
49. Bach RR. Tissue Factor Encryption. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2006;26:456-461.

50. Versteeg HH, Spek CA, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathway. *Molecul Med* 2004;10:6-11.
51. Tehrani M, Friedman T, Olson J, Brat D. Intravascular thrombosis in central nervous system malignances: a potential role in astrocytoma progression to glioblastoma. *Brain Pathol.* 2008;18:164-171.
52. Milsom C, Rak J. Tissue factor and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2007;36:160-176.
53. Pengo et al. *Thromb Haemost.* 2009;7abstr OC-MO-015.
54. Falanga A. The effect of anticoagulant drugs on cancer. *J. Thromb. Haemost.* 2004;2:1263-5.
55. Marray J, Precious E, Alikhan R. Catheter-related thrombosis in cancer patients. *Br J Haematol.* 2013;162:748-57.
56. [www. met lab.pl/ELISA](http://www.metlab.pl/ELISA).
57. Vujanic GM et al. Revised International Society of Pediatric Oncology (SIOP) working clasification of renal tumours of childhood). *Med. Pediatr. Oncol.* 2002;38:79-82.
58. Kowalczyk J. Epidemiologia nowotworów złośliwych u dzieci. W: *Onkologia i Hematologia Dziecięca*. Chybicka A, Sawicz-Birkowska K. (red.) PZWL, Warszawa 2008.
59. Michalak S, Kozubski W. Udar żylny mózgu w przebiegu choroby nowotworowej. *Udar mózgu.* 2010;12:42-46.
60. Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* 2000;102:215-224.
61. Lyman GH, Khorana AA. Cancer, clots and consensus: New understanding of an old problem. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:4821-6.
62. Ważna E. Płytki krwi jako regulatory procesów odpornościowych. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006;60:265-277.
63. Goubran HA, Stakiw J, Radosevic M, Burnouf T. Platelets effects on tumor growth. *Semin Oncol.* 2014 Jun;41(3):359-69.
64. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;29:3056-61.
65. Verheul HMW, Hoekman K, Lupu F et al Platelet and coagulation activation with vascular endothelial groth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clinical Cancer Research.* 2000;6:166-171.
66. Gouin-Thibault I, Samama MM. Laboratory diagnosis of the thrombofilic state in cancer patients. *Sem Thromb Hemost.* 1999;25:167-172.

67. Ilhan-Mutlu A, Starlinger P, Perkmann T et al. Plasma fibrinogen and blood platelet counts are associated with response to neoadjuvant therapy in esophageal cancer. *Biomark Med.* 2015;9:327-35.
68. Morimoto Y, Nouse K, Wada N et al. Involvement of platelets in extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014;44:353-9.
69. Stegner D, Dütting S, Nieswandt B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thromb Res.* 2014;133Suppl 2:S149-57.
70. Moller Pedersen L, Milman N. Prognostic significance of thrombocytosis in patients with primary lung cancer. *Eur Respir J.* 1996;9:1826-1830.
71. Araneda M, Krishnan V, Hall K et al. Reactive and clonal thrombosis: proinflammatory and hematopoietic cytokines and acute phase proteins *South Med. J.* 2001;94:417-420.
72. Haidopoulou K, Goutaki M, Lemonaki M et al. Reactive thrombocytosis In children with Vidal respiratory tract infections. *Minerva Pediatr.* 2011;63:257-262.
73. Hernandez E, Lavine M, Dunton CJ et al. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with cervical cancer. *Cancer* 1992;69:2975-2977.
74. Ferrigno D, Buccheri G, Ricca I. Prognostic significance of blood coagulation test in lung cancer. *Eur Respir J.* 2001;17:667-673.
75. Taguchi O, Gabazza EC, Yasui H et al. Prognostic significance of plasma D-dimer levels in patients with lung cancer. *Thorax* 1997;52:563-565.
76. Son HJ, Park JW, Chang HJ. Preoperative plasma hyperfibrinogenemia is predictive of poor prognosis in patients with nonmetastatic coloncancer. *Ann Surg Oncol* 2013;20:2908-13.
77. Giordano P., Molinari A.G., Del Vecchio G.C. et al. Prospective study of hemostatic alteration In children with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Hematol.* 2010;85:325-330.
78. Athale U, Moghrabi A, Naviager T et al. Von Willebrand factor and thrombin activation in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: an impact of peripheral blasts. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:963-9.
79. Mall V, Thomas KB, Sauter S et al. Effect of glucocorticoids, E. coli- and Erwinia L-asparaginase on hemostatic proteins in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Paediatr.* 1999;211:205-210.
80. Murray JC, Dorman SR, Brandt ML, Dreyer ZE. Renal venous thrombosis complicating acute myeloid leukemia with hyperleukocytosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1996;18:327-30.
81. Schiavetti A, Foco M, Ingrosso A, et al. Venous thrombosis in children with solid tumors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30:148-52.
82. Schiavetti A, Foco M, Chiriaco D et al. Venous thrombosis and procoagulation factors of high-risk neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32:93-6.

83. Tas F, Kilic L, Serilmez M, et al. Clinical and prognostic significance of coagulation assay in lung cancer. *Respr. Med.* 2013;107:451-457.
84. Shu Y-J et al. Clinical and prognostic significance of preoperative plasma hyperfibrinogenemia in gallbladder cancer patients following surgical resection: a retrospective and in vitro study. *Cancer* 2014;14: 566-578.
85. Morii T, Mochizuki K et al. D-dimer levels as a prognostic factor for determining oncological outcomes in musculoskeletal sarcoma. *Musculoskeletal Disorders* 2011;12:250.
86. Inal T, Anar C, Polat G et al. The prognostic value of D-dimer in lung cancer. *Clin Respir J.* 2014;11: doi: 10.1111.
87. Tas F, Cifti R, Kilic L. Clinical and prognostic significance of coagulation assays in melanoma. *Melanoma Research* 2012;22:368-375).
88. Demidowicz E, Moppert J, Nowacka A. Z i inni. Nadpłytkowości pierwotne i wtórne u dzieci. *Pediatrics Polska.* 2015;90:114-120.
89. Mantidakis E, Tsalkidis A, Chatzimichael A. Thrombocytosis in childhood. *Indian Pediatr.* 2008;45:669-677.
90. Raj SD, Zhou X, Bueso-Ramos CE et al. Prognostic significance of elevated D-dimer for survival in patients with sarcoma. *Am J Clin Oncol* 2012;35:462-467.
91. Walter J, Handel LL, Brodhun M et al. Expression of coagulation factors and their receptors in tumor tissue and coagulation factor upregulation in peripheral blood of patients with cerebral carcinoma metastases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:141-51).
92. Parhami-Seren B, Butenas J, Krudysz-Amblo J, Mann KG. Immunologic quantitation of tissue factors. *Thromb Haemost.* 2006; 4: 1749–1755.
93. Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:4834-4838.
94. Bluff JE, Brown NJ, Reed MWR, Staton CA. Tissue factor, angiogenesis and tumor progression. *Breast Cancer Research.* 2008;10:1871-81.
95. Kotschy M, Kotschy D, Witkiewicz W. Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi oraz w powikłaniach zakrzepowych. *Kardiologia Polska.* 2010; 68: 1158–1162.
96. Song HB, Park KD, Kim JH, et al. Tissue factor regulates tumor angiogenesis of retinoblastoma via the extracellular signal regulated kinase pathway. *Oncology Reports* 2012;28:2057-2062.
97. van den Berg Yascha W, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH. The relationship between Tissue factor and cancer progresion: insights from bench and bedside. *Blood* 2012;119:924-32.

98. Yu JL, May L, Lhotak V et al. Oncogenic events regulate Tissue factor expression In colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005;105:1734-1741.
99. Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C et al. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate Tissue factor expression In glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res.* 2009;69:2540-2549.
100. Magnus N, Asti ED, Garnier D et al. Brain neoplasms and coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:881-91).
101. Geddings J, Mackman N. Tumor- derived tissue factor – positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood.* 2013;122:1873-1880.
102. Ruf W. Tissue factor and cancer. *Thromb Res.* 2012;130).
103. Gieseler F, Luhr I, Kunze T et al. Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy. *Thromb Haemost.* 2007;97:1023-1030.
104. Vormittag R, Simanek R, Ay C, High factor VIII levels independently predict venous thromboembolism in cancer patients: the cancer and thrombosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:2176-81.
105. Li W, Keller GA. An antibody to VEGF upregulates factor VIII via interleukin-1 in activated adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:493–512.
106. Franchini M, Targher G, Manzato F et al. Acquired factor VIII inhibitors in oncohematology; a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Jun;66:194-9.
107. Sallah S, Wan JY. Inhibitors against factor VIII In patients with cancer. Analysis of 41 patients. *Cancer.* 2001;91:1067-1074.
108. Buczman A, Windyga J. Hemofilia Nabyta. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007;117:241-246.
109. Franchini M, Zaffanello M, Lippi G. Acquired hemophilia in pediatrics: a systematic review. *Pediatr. Blood Cancer.* 2010;55:606-611.
110. Granger J, Gidvani VK. Acquired factor VII deficiency associated with Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52:394-5.
111. Franchini M, Lippi G, Montagnana M, et al. Hemophilia and cancer: A New challenge for hemophilia centers. *Blood Transfus.* 2013;11:26-31.
112. Dunn AL., Austin H, Soucie JM. Prevalence of malignancies among U.S. male patients with haemophilia: a review of the Haemophilia Surveillance System. *Haemophilia.* 2012;18:532-539.
113. Miesbach W, Seifried E. Does haemophilia influence cancer-related mortality in HIV-negative patients? *Haemophilia.* 2011;17:55-60.
114. Beckwith JB. New development in the pathology of Wilms' tumor. *Cancer Invest.* 1997;15:153-162.