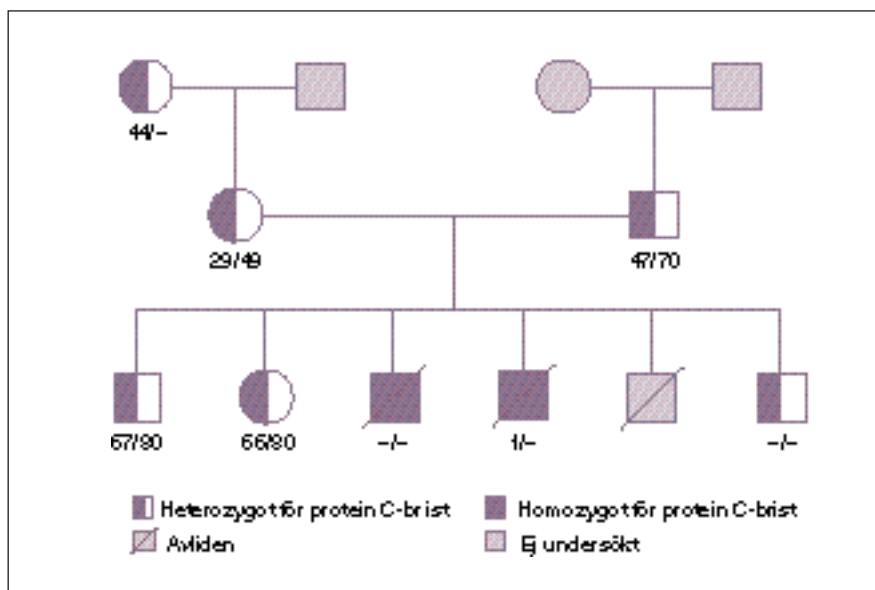


Fosterdiagnostik kan avslöja homozygot protein C-brist

Vid protein C-brist uppträder svåra organmanifestationer till följd av trombosbildning, ibland redan i livmodern. Trots tillgång till substitutionsterapi med protein C-koncentrat kan man tyvärr inte alltid undvika allvarliga livshotande symtom i nyföddhetsperioden. Fosterdiagnostik baserad på DNA-teknik kan emellertid ge viktig information vid graviditet eller inför framtida graviditeter.

Protein C-systemet har under senare år alltmer kommit att stå i fokus för koagulationsforskningen. Upptäckten av APC-(aktiverat protein C)resistens som förklaring till cirka hälften av fallen med familjär trombofili [1] är ett exempel på hur dessa kunskaper fått klinisk betydelse.

Nedan följer en fallpresentation av en patient med neonatal purpura fulminans (PF) orsakad av medfödd homozygot form av protein C-brist. Detta ovanliga sjukdomstillstånd med en beräknad incidens på 1/200 000–400 000 födselar illustrerar väl protein C-systemets avgörande betydelse för en fungerande



Figur 1. Mutationsanalys i den undersökta familjen samt protein C-nivåer enligt funktionell/immunologisk metod; - anger att test avseende protein C-nivå ej utförts.

antikoagulation. Vi vill med denna artikel fästa uppmärksamhet på ett syndrom som, trots att det är så sällsynt, är av vikt att känna till, inte minst då prenatal diagnostik nu börjar bli tillgänglig.

Fall med homozygoti för protein C-brist

En 26-årig väsentligen frisk kvinna utan hereditet för tromboembolisk sjukdom föder sitt tredje barn, en pojke (1988). Familjen har tidigare två friska barn födda 1983 och 1986. Den nu aktuella graviditeten har förlöpt utan anmärkning.

Barnet föds i vecka 36 efter framgångsrikt vändningsförsök på grund av sätesläge som följs av tidig vattenavgång. Utdrivningsförloppet blir snabbt och barnet framföds med navelsträngen hårt om halsen. Apgarpoängen är 7-7-10 med avdrag för hudfärg, tonus och retbarhet. Födelsevikt är 2 690 gram. Vid undersökning av barnet finner man ett något stort rundat huvud med normal fontaneltension, bilaterala ögonförändringar samt en palpabel resistens till höger i buken. Ultraljud och datortomo-

grafi av hjärnan visar bild som vid hydranencefali.

Oftalmologisk undersökning ger vid handen att pojken har bilateral katarakt. Ultraljud av buken visar att den resistens som palperas i buken betingas av en ventralt lateralt förskjutet men ej säkert förstörad höger njure; misstanke om njurventrombos framkastas.

Då pojken är 16 dagar gammal noteras ett nyttillkommet blåmissfärgat område, cirka 3×6 cm i diameter, i höger fossaregion. Lesionen har initialt utseende av ett hematom men senare tillkommer hemorragiska blåsor. Buken är mjuk vid palpation. Under de närmaste två veckorna ses en successiv utökning av det missfärgade områdets storlek samtidigt som pojkens allmäntillstånd försämras. Hudbiopsi visar trombotisering med fibrinutfällning i kärlen i dermis utan medföljande inflammatorisk reaktion. Detta fynd väcker tanken om en eventuell koagulopati, i första hand homozygot protein C-brist, med trombosbildning i multipla organ som bakomliggande orsak till pojkens sjukdomsbild. Koagulationsprover skickas till koagulationslaboratoriet, Universitetssjukhuset MAS, Malmö. Dessa visar att pojken har 10 procent av normalt protein C-värde, det vill säga den misstänkta diagnosen kan inte verifieras. ▶

Författare

ANNA JERKEMAN

ST-läkare, sektionen för hematologi/koagulation, Universitetssjukhuset MAS, Malmö

PER HENRIKSSON

docent, överläkare, barn- och ungdomskliniken, Lasarettet, Helsingborg

NILS-OLOF JONSSON

överläkare, barnmedicinska kliniken, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping

ERIK BERNTORP

docent, överläkare, sektionschef vid sektionen för hematologi/koagulation, Universitetssjukhuset MAS, Malmö.

ANNONS

ANNONS

Möjligt är det uppmätta värdet delvis påverkat av tidigare plasmatransfusion. Trettionio dagar gammal avlider pojken stilla. För att försöka bringa klarhet i fallet igångsätts en familjeutredning som visar att såväl mor som far, samt mormor, är heterozygoter för protein C-brist av typ II (Figur 1).

Föräldrarna kommer från olika släkter av svenskt ursprung, såvitt känt från minst tre generationer tillbaka. Tromboembolisk venös sjukdom har inte förekommit i släkten på någondera sidan vad föräldrarna vet. Övrig trombosutredning, inkluderande APC-resistens, protein S- och antitrombin III-brist, utfaller negativt.

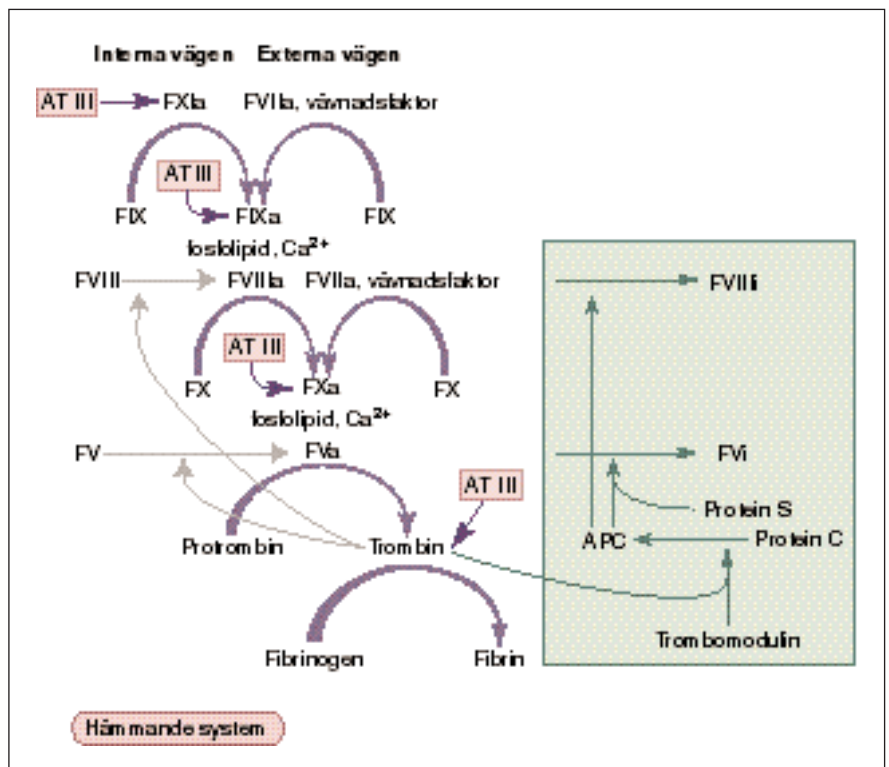
Fosterdiagnostik vid nästa graviditet

Då föräldrarna tidigt är inställda på en ny graviditet och frågan om möjlighet till prenatal diagnostik väcks etableras ett samarbete med dr David Cooper, Thrombosis research institute, University of London (senare vid Institute of medical genetics, University of Wales, College of medicine, Cardiff) för att om möjligt påvisa den för familjen aktuella mutationen.

Blodprovsanalyser med mätning av protein C-nivåerna visar att mor, far samt de båda barnen alla är heterozygota för protein C-brist, det vill säga har protein C-värden passande med heterozygoti för bäarskap av protein C-bristgenen. Molekylär diagnostiken påvisar en basparförändring hos modern vilken skulle kunna tjäna som underlag för prenatal diagnostik.

I november 1993 är modern ånyo gravid och korionbiopsi utförs i vecka 11. Den molekylärgenetiskt baserade prenataldiagnostiken blir tyvärr dock ej konklusiv och det väntade barnet är minst heterozygot för protein C-brist och har 50 procents risk att vara homozygot. Därför beslutades om fetal blodprovstagning för analys av protein C-nivåer hos fostret, vilken utförs vid Rigshospitalet i Köpenhamn (dr Jens Bang) i graviditetsvecka 18 respektive 30. Mätt med immunologisk metod är protein C-värdet 2 respektive 3 procent och med aktivitetsmetod 0 respektive 0,5 procent vid de olika mättillfällena. Samtidigt har faktor IX-aktiviteten (faktor IX är liksom protein C K-vitaminberoende) stigit från 6 till 13 procent och misstanken om att homozygoti för protein C-brist föreligger hos fostret är nu stark. Redan efter den första blodprovstagningen informeras föräldrarna om risken för homozygoti men man beslutar sig för att fortsätta graviditeten. Ultraljudsundersökning i samband med provtagningarna visade inget onormalt.

Man beslutar att låta graviditeten



Figur 2. Översiktlig bild av plasmakoagulationen.

fortsätta fram till 35 fullbordade veckor med planerat sectio. Graviditeten avbryts på så sätt något i förtid vilket på teoretiska grunder anses kunna minska riskerna för trombosutveckling hos fostret in utero. Waranbehandling av modern under den återstående graviditeten diskuteras, men man avstår från detta på grund av risken för blödningskomplikationer.

I vecka 35 + 4 utförs sectio som planerat. Barnet, en pojke, är vid framförandet fullt vitalt och har en födelsevikt av 2 800 gram. Man noterar vid operationen att placenta på moderns sida delvis är trombotiserad. Efter provtagning för protein C-bestämning erhåller pojken protein C-koncentrat. Då protein C-värdet i förprovet är oförändrat jämfört med de prenatala provtagningarna, och övriga K-vitaminberoende koagulationsfaktorer visar för åldern normala värden, kan diagnosen homozygoti för protein C-brist anses vara fastställd. Trettio minuter efter avslutad infusion ligger protein C-värdet på 64 procent, således en fullgod nivå och därefter erhåller barnet protein C-infusioner var åttonde timme under det närmaste dygnet.

Ett par timmar efter födelsen börjar pojken få relativt täta kramper och fortsatt utredning med ultraljud och dator-tomografi av skallen visar utbredda substansförluster och vidgning av ventriklarna. Ögonundersökning visar tät katarakt och korneagrulning bilateralt. Pojken uppvisar således en bild som vid

homozygot protein C-brist, och på grund av skadornas grava karaktär avbryts behandlingen med protein C-koncentrat. Barnet överförs vid fem dagars ålder till hemortslasarettet där man observerar tilltagande huvudomfång och suturdiastas. Man beslutar i samråd med föräldrarna att avstå från aktiva åtgärder. Pojken utvecklar vid 17 dagars ålder ekkymoser i huden vilka tilltar i omfattning samtidigt som han successivt försämras. Pojken avlider 22 dagar gammal.

I september 1995 har den aktuella mutationen i protein C-genen kunnat fastställas. Båda föräldrarna är heterozygota för samma genlesion (GGC→GCC; Gly 347→Ala). Prov från parets två avlidna barn visar homozygoti för genlesionen. Möjligheterna för direkt prenatal mutationsdiagnostik finns nu.

I mars 1996 får modern ett tidigt missfall efter planerad graviditet och i oktober 1996 är ytterligare en graviditet ett faktum. Vävnadsprov från korionbiopsi visar nu heterozygoti för protein C-genlesionen. Graviditeten och förlossningen förlöper normalt och barnet utvecklas normalt i nyföddhetsperioden.

Protein C-systemet

Protein C är ett K-vitaminberoende glykoprotein som syntetiseras i levern och cirkulerar i plasma som ett proenzym. Proenzymet beskrevs och namngavs första gången 1976 av J Stenflo [2]. Aktiveringen av protein C sker i kapillärbädden genom inbindning till komplexet trombomodulin/trombin.

Aktiverat protein C är ett serinproteas som med hjälp av kofaktorn protein S utövar sin antikoagulant effekt genom att inaktivera faktor Va samt faktor VIIIa genom begränsad proteolys. På detta sätt åstadkoms en negativ feedback på koagulationsmekanismen längs både den interna och gemensamma vägen (Figur 2). Man har nyligen upptäckt att även faktor V kan fungera som kofaktor till protein C, men den exakta mekanismen är ännu okänd [3]. Aktiverat protein C antas också stimulera fibrinolysen, delvis genom att neutralisera plasminogenaktivatorinhibitor typ 1 (PAI-1) [4].

Heterozygoti relativt vanligt

Diagnostik av protein C-brist har fram tills på senare år skett enbart genom analys av protein C-aktivitet samt protein C-antigennivå i plasma. I en population av trombospatienter har incidensen av heterozygot protein C-brist beräknats till cirka 3–8 procent [5]. Samtidigt har det visat sig att heterozygoti för protein C-brist ses hos 0,1–0,3 procent i en normalbefolkning [6] och således är relativt vanligt förekommande. Många av dessa individer utan anamnes på tromboembolism har heller ingen positiv släktanamnes för tromboembolisk sjukdom. Ett problem vid diagnostik av protein C-brist är den överlappning i protein C-aktivitet som ses mellan normalindivider och heterozygoter. Ett stort antal av de individer som med DNA-teknik kunnat identifieras som heterozygoter kan uppvisa normala protein C-aktivitetsnivåer samtidigt som en del individer utan påvisbara defekter i protein C-genen kan ha subnormala värden. Förekomsten av homozygot protein C-brist har estimerats till 1 på 200 000–400 000 födselar [7].

Recessiv eller dominant?

På basen av ovanstående kliniska och laboriemässiga observationer har två fenotypiskt distinkta grupper kunnat urskiljas.

I den ena gruppen har en autosomalt dominant ärftlighetsgång antagits föreliggande. Här uppvisar heterozygoter ökad förekomst av venös tromboembolism, ibland redan i tidig ålder.

I den andra gruppen har protein C-bristen kliniskt uttryckt sig som en autosomalt recessiv sjukdom. Här finner man ingen ökad trombosförekomst hos heterozygoter medan homozygoter insjuknar i bilden av purpura fulminans redan i neonatalperioden.

Denna indelning har förvirrats något av fyndet att mutationen i protein C-genen kan vara densamma vid dessa två förment olika tillstånd. En del av förklaringen till detta fenomen kan ligga i

att protein C-brist i sig är en relativt svag riskfaktor för tromboembolism och att de heterozygota individer som manifesterar sig med trombosjukdom i själva verket har additiva riskfaktorer, exempelvis APC-resistens [8, 9]. Det faktum att många föräldrar till barn med homozygot protein C-brist och purpura fulminans ej har någon anamnes på trombos kan också förklaras av att dessa individer vid tiden för barnets födelse är såpass unga att deras heterozygota protein C-brist ännu är »kompenserad». Risken för tromboembolism för personer med trombosdisponerande rubbningar ökar nämligen med stigande ålder. Protein C-brist får således anses vara en autosomalt recessiv sjukdom där det varierande kliniska utfallet hos heterozygoter kan förklaras av närvaro eller frånvaro av additiva riskfaktorer, såväl kemiska faktorer som omgivningsfaktorer.

Protein C-brist kan också indelas på basen av utfallet i funktionella tester som antigenester. Vid protein C-brist typ I (vilken är den vanligast förekommande) ses både sänkt halt av antigenet samt sänkt protein C-aktivitet. Vid typ II ses ett funktionellt defekt protein och antigenivåerna kan vara normala.

Tillgången till DNA-tekniker har givit nya möjligheter till förbättrad diagnostik vid protein C-brist. Den/de gen-defekt(er) som ligger bakom protein C-bristen hos den enskilde patienten kan bestämmas och genom släktstudier kan mer tillförlitlig och otvetydig information angående ärftlighetsgång och subtyper av protein C-brist komma att erhållas. En databas av hittills identifierade mutationer har nyligen upprättats och kommer kontinuerligt att uppdateras [10]. Till dags dato har mer än 160 olika mutationer ledande till protein C-brist identifierats.

Hud-, CNS- och ögonsymtom

Det första fallet av homozygot protein C-brist beskrevs 1983 [11] och därefter har ytterligare ett tjugotal fall publicerats. De huvudsakliga symtomen vid purpura fulminans associerad med homozygot protein C-brist är:

- hudlesioner i form av ekkymoser med inslag av nekroser och purpura
- CNS-skador
- ögonskador.

Barnets ålder vid symtomdebut har vanligen varierat från 1–2 timmar upp till 5 dagar. Oftast har dock symtomdebut skett mellan 2 och 22 timmars ålder.

Hudlesionerna har i huvudsak uppträtt på extremiteter men också i glutealregionen samt på buk, scrotum och huvud. Även på lokaler som utsatts för trauma i form av exempelvis tryck eller injektioner har hudlesioner kunnat ut-

vecklas. Lesionerna börjar som 1–4 cm stora ekkymoser som tillväxer radiärt och kan bli upp till 20–25 cm i diameter. Senare tillkommer hemorragiska hudblåsor och nekroser vilka kan utveckla sig till gangrän med, i värsta fall, förlust av exempelvis en extremitet. Om patienten erhåller behandling mot sin protein C-brist kan de nekrotiska lesionerna läka ut. Läkningförloppet tar i regel 4–8 veckor och efterlämnar ofta stora ärr.

De CNS-skador barnen drabbas av har sin grund i CNS-tromboser som kan leda till sekundära blödningar och hydrocefalusutveckling. Dessa skador kan medföra mental retardation eller försenad psykomotorisk utveckling [11, 12]. Skadorna på CNS kan sannolikt inträffa redan in utero och är då alltså manifesterade vid födelsen [13, 14]. Huvuddelen av dessa barn har ögonskador som lett till total eller partiell blindhet, betingat av tromboser i ögats vener med sekundära blödningar i glaskropp och retina [12].

Under den akuta fasen uppvisar patienterna laboriemässigt en bild som ur koagulationssynvinkel uppfyller kriterierna för DIC (disseminerad intravasal koagulation). Sålunda ses tecken till såväl konsumtion av koagulationsfaktorer och trombocyter (sänkta värden för trombocyter och PK – protrombin-komplex, förlängd APTT – aktiverad partiell tromboplastintid) som ökad fibrinolys (sänkt fibrinogen, höga D-dimerer). Protein C-aktivitetsnivåerna har (i de flesta fall) varit omätbart låga medan protein C-antigenivåerna varierar beroende på typ av protein C-brist (typ I eller II, se ovan). Förklaringen till att barnet ej avlider redan in utero kan vara att den fetala levern producerar reducerade mängder av samtliga K-vitaminberoende koagulationsfaktorer vilket skulle kunna motverka trombos [15].

Det finns också rapporter om ett fördröjt och betydligt mildare insjuknande vid homozygot protein C-brist [16]. Dessa skillnader i kliniska uttryck avspeglar sannolikt olikheter vad gäller de mutationer i protein C-genen som givit den identifierade protein C-bristen.

Olika typer av behandling

Den akuta behandlingen har tidigare bestått i tillförsel av färskfrusen plasma eller protrombinkomplexkoncentrat, följt av antivitamin K-behandling i den kroniska fasen. Ett framgångsrikt fall av levertransplantation för att korrigera bristen finns också rapporterat [17]. Färskfrusen plasma innehåller låga koncentrationer av protein C varför tillförsel av stora volymer varit nödvändig. Detta har i sin tur lett till problem med

övervätskning, hyperproteinemi och hypertoni. Behandling med protrombinkomplexkoncentrat har fördelen att koncentrationerna av protein C är högre. Preparatet innehåller dock ej enbart protein C utan flera andra koagulations- och antikoagulationsfaktorer vilka kan interferera med tillfört protein C, vilket i något fall lett till tromboskomplikationer.

1991 genomfördes den första behandlingen med protein C-koncentrat på en patient med homozygot protein C-brist och purpura fulminans [18]. Behandlingen gav god utläkning av purpuralesionerna och kunde genomföras utan större biverkningar under en längre övergångsperiod (åtta månader) till dess att antivitamin K-behandling var etablerad. Konsumtion av tillfört protein C minskade successivt så att doseringsintervallen kunde förlängas efter den akuta fasen. Vid tillgång till protein C-koncentrat är denna senare behandling sannolikt att föredra. Då sjukdomen förorsakas av en punktmutation i en enskild gen kan man även tänka sig att tillståndet i en framtid vore väl ägnat för behandling med genterapi.

Molekylärgenetisk diagnostik alltmer tillgänglig

Den aktuella familjen och tillgängliga litteraturdata visar att homozygot protein C-brist är ett mycket allvarligt tillstånd. Liksom i vår familj får man förmoda att tromboskomplikationerna ofta uppträder in utero och är av så svårartad karaktär att behandling, åtminstone efter partus, ofta inte är meningsfull. Trots förekomsten av heterozygot protein C-brist på såväl moderns som faderns sida föreligger ingen trombosanamnes i släkterna vilket alltså visar att homozygot protein C-brist kan uppträda utan förvarning i form av klinik hos tidigare familjemedlemmar. Nyfödda barn som uppvisar ovan beskriven klinisk symtombild, samt laboratoriemässiga tecken till konsumtion av koagulationsfaktorer och ökad fibrinolys, bör väcka misstanke om homozygot protein C-brist och föranleda kontakt med koagulationslaboratorium för utredning. Detta för att erhålla anvisningar angående provtagning för bestämning av protein C-aktivitet och antigenivå följt av snabbt insättande av specifik terapi. Eftersom molekylärgenetisk diagnostik börjar bli alltmer tillgänglig vid protein C-brist kan en sådan utredning innebära möjlighet till säker prenatal diagnostik avseende eventuella framtida graviditeter.

Referenser

1. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously

unrecognized mechanism characterized by poor response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1004-8.

2. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976; 251: 355-9.
3. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269: 18735-8.
4. Comp PC, Esmon CT. Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J Clin Invest* 1981; 68: 1221-8.
5. Allaart CF, Port SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briët E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency. *Lancet* 1993; 341: 134-8.
6. Miletič JP, Sherman L, Broze GJ Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317: 991-6.
7. Marlar RA, Neumann A. Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16: 299-309.
8. Koeleman BPC, Reitsma CF, Allart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-5.
9. Gangrille S, Greengard JS, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague JF, Abgrall B, Jude JH et al. Incidence of protein C resistance caused by the ARG 506 GLN mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C-deficient patients. *Blood* 1995; 86: 219-24.
10. Reitsma PH, Poort SR, Bernardi F, Gandrille S, Long GL, Sala N et al. Protein C deficiency: a database of mutations. *Thromb Haemost* 1993; 69: 77-84.
11. Branson HE, Katz J, Marble R, Griffin JH. Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura in a newborn infant. *Lancet* 1983; 2: 1165-8.
12. Dreyfus M, Masterson M, David M, Rivard GE, Müller FM, Kreuz W et al. Replacement therapy with a monoclonal antibody purified protein C concentrate in newborns with severe congenital protein C deficiency. *Semin Thromb Haemost* 1995; 21: 371-81.
13. Marciniak E, Wilson HD, Marlar RA. Neonatal purpura fulminans: A genetic disorder related to the absence of protein C in blood. *Blood* 1985; 65: 15-20.
14. Peters C, Casella JF, Marlar RA, Montgomery RR, Zinkham WH. Homozygous protein C deficiency: Observations on the nature on the molecular abnormality and the effectiveness of Warfarin therapy. *Paediatrics* 1988; 81: 272-6.
15. Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A et al. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 1984; 310: 559-62.
16. Tuddenham EGD, Tahase T, Thomas AE. Homozygous protein C deficiency with delayed onset of symptoms at 7 to 10 months. *Thromb Res* 1989; 53: 475-84.
17. Casella JF, Bontempo FA, Markel H, Lewis JH, Zitelli BJ, Starzl TE. Successful treatment of homozygous protein C deficiency by hepatic transplantation. *Lancet* 1988; 8583: 435-7.
18. Dreyfus M, Magny JF, Bridey F, Schwarz HP, Planché C, Dehan M et al. Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified pro-

tein C concentrate. *N Engl J Med* 1991; 325: 1565-8.

Summary

Homozygous protein C deficiency detectable by prenatal diagnosis

Anna Jerkeman, Per Henriksson, Nils-Olof Jonsson, Erik Berntorp

Läkartidningen 1997; 95: 3772-7

Homozygous protein C deficiency (HPCD) with purpura fulminans is a rare condition with an estimated incidence of 1-2 per 400,000 births. About 20 case reports have appeared since the first one was published in 1983. HPCD provides an excellent illustration of the fundamental importance of the protein C anticoagulant pathway. This severe coagulopathy results in serious organ damage, often already in utero, and without treatment it is incompatible with life. The treatment options include fresh frozen plasma and protein C concentrate in the acute phase, followed by oral anticoagulant therapy. Over 160 different point mutations in the protein C gene have been identified in recent years, offering new possibilities for prenatal diagnosis. The article describes the case of a family who lost two children with congenital HPCD, but where the specific point mutation was identified thus enabling prenatal diagnosis to be performed in a subsequent pregnancy.

Correspondence: Dr Anna Jerkeman, Dept for Coagulation Disorders, Universitetssjukhuset MAS, Malmö, S-205 02 Malmö.