

İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Serbest Protein S Düzeylerindeki Düşüklüğün Önemi

U. YILMAZ, S. AYAZ, Ç. BAYSAL, B. YILDIRIM, A. ÜLKER, L. ONARAN

Özet: İnflamatuvar barsak hastalığında (İBH) tromboembolik komplikasyonlar olması ve mikrovasküler trombozise bağlı iskeminin inflamatuvar olayları başlatılabileceği hipotezine dayanarak protein C (PC) ve serbest protein S (SPS) düzeyleri ülseratif kolit (ÜK), Crohn hastalığı (CH) ve kontrol gruplarında araştırıldı. Çalışma ÜK (N=36, 17 kadın, 19 erkek), CH (N=11, 5 kadın, 6 erkek) ve kontrol grubu (N=17, 8 kadın, 9 erkek) olmak üzere 3 grupta yapıldı. İBH grubundaki her hastaya kan örneği almadan önce rektoskopi veya kolonoskopi yapılarak endoskopik ve klinik aktivite indeksleri belirlendi. Tüm olgularda SPS, PC, C4b - BP, hemogram, hemostaz testleri, biyokimyasal testler, faktör V, faktör VIII, akut faz reaktanları araştırıldı. SPS düzeyleri ÜK, CH ve kontrol gruplarında sırasıyla ortalama % 41.3333, % 24.0909, % 89.75 bulundu. SPS düzeyleri İBH gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.0001$). Bu düşüklük ÜK grubunda CH grubuna göre belirgin olarak daha fazlaydı ($p<0.001$). SPS düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasında korelasyon saptanmadı. PC ve C4b - BP üç grup arasında farklı bulunmadı. Sonuç olarak İBH'da SPS düzeylerinin sağlıklı insanlara göre belirgin bir şekilde düşük olduğu, bu düşüklüğün hastalık aktivitesi ile ilişkili olmadığı, patogeneizde önemli rolünün olabileceği kanısına varıldı.

Summary: THE IMPORTANCE OF REDUCED FREE PROTEIN S LEVELS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Protein C and protein S levels were measured in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and healthy subjects to investigate the hypothesis of ischemia in the pathogenesis of IBD. Investigation studied on groups of ulcerative colitis (UC) (n=36), Chron's disease (CD) (n=11) and control (n=17). Rectoscopy or colonoscopy was performed to determinate the severity of disease on each patients with IBD before the blood sampling for biochemical, hematological, and the others. Hemogram, biochemical analysis, acute phase reactants, hemostasis test, Factor V, Factor VIII, free protein S (FPS), protein C (PC) and C4b-binding protein (C4b-BP) was investigated in each subject. Bacteriologic examinations of stool were also investigated. Serum FPS level was found in UC, CD and control group 41.3333 %, 24.0909 %, 89.7500 % respectively. FPS level was reduced significantly in IBD than controls ($P<0.0001$). FPS level was also reduced in CD group as compared with UC group ($p<0.001$). No correlation was found between FPS level and disease activity. PC and C4b-BP concentrations did not differ significantly between IBD patients and healthy subjects ($p>0.05$). Present results showed that serum FPS levels in patients with IBD are reduced compared with healthy subjects, these reduced levels are not correlated with disease activity and these findings may be important role in the pathogenesis of IBD and also play a major role for the increased tendency to venous thromboembolism in this disease.

Anahtar kelimeler: İnflamatuvar barsak hastalığı, etyoloji, biokimya, protein S, protein C

Key words: Inflammatory bowel disease, etiology, biochemistry, protein S, protein C

İBH etyolojisi henüz aydınlatılabilmiş değildir. Hastalığın etyopatogenezinde genetik, infeksiyöz, diyetetik, immünolojik, vasküler mekanizmalar öne sürülmüştür (1). Öne sürülen mekanizmalarda belli ölçülerde haksızlık olmakla birlikte hiçbirisi patogenezi tam olarak aydınlatmamaktadır.

İBH'da tromboembolik komplikasyonların gelişmesi, patogeneizde trombotik olayların rol oynayabileceğini düşündürmüş ve bu görüşü destekler çalışmalar yapılmıştır (1).

Protein C, K vitaminine bağımlı 56.000 Da molekül ağırlığında bir protein olup, Faktör V ve Faktör VIIIc'yi inaktive eder ve plazminojen inhibitörünü nötralize ederek antitrombotik etki

Tablo I: Endoskopik aktivite kriterleri

Granülasyon	yok	(0)
Vaskülarite	var	(1)
Franjilite	normal	(0)
Mukoza hasarı (mukus, fibrin, exuda, erozyon, ülser)	hafif bozuk	(1)
	tamamen bozulmuş	(2)
	yok	(0)
	hafif var	(1)
	şiddetli	(2)
	etkilenmemiş	(0)
	hafif etkilenmiş	(2)
	şiddetli etkilenmiş	(4)

gösterir (2). Protein S 62.000 Da molekül ağırlığında, K vitaminine bağımlı bir protein olup protein C ile kompleks teşkil ederek kofaktör etkisi gösterir (2). Protein S'in %60'ı plazmada bulunan kompleman sistemine ait bir protein olan C4b - Bağlayıcı protein'e (C4b - BP) bağlı olarak %40'ı serbest halde bulunur. Bağlı fraksiyonun etkisi yoktur. Akut inflamatuvar olaylar C4b - BP düzeylerini artırarak serbest fraksiyon düzeyini düşürürler (3). Protein C ve protein S eksikliğine bağlı hereditör tromboembolik ataklar gösteren hastalar bildirilmiştir (4). Tromboembolik komplikasyonları bulunan IBH olan bireylerde protein C ve protein S düzeylerinde düşüklük olduğu gösterilmiştir (4).

İBH'lı hastalarda serbest protein S (SPS), protein C ve C4b - BP düzeylerini sağlıklı bireylerle karşılaştırmalı olarak saptamak, bu proteinlerde düşüklük olup olmadığını diğer hemostaz parametreleri ile beraber araştırmak ve İBH patogenezindeki rolünü tartışmak amacıyla kontrollü çalışma yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma ülseratif kolit (ÜK) (N=36, 17 kadın, 19 erkek), Crohn hastalığı (CH) (N=11, 5 kadın, 6 erkek) ve kontrol (N=17, 9 kadın, 8 erkek) olmak üzere 3 grupta yapıldı. Karaciğer fonksiyon bozukluğu ve primer hematolojik patoloji tespit edilen olgular çalışmaya alınmadılar. Hastalık gruplarında günlük dışkılama sayısı, dışkıda kan, ağrı, kilo kaybı, rektoskopik veya kolonoskopik bulgulara göre hastalık aktiviteleri belirlendi. Ülseratif kolit için Rachmilewitz ve arkadaşları tarafından daha önce tanımlanmış olan endoskopik aktivite indeksi (5) ve Seo ve arkadaşlarınca tanımlanan aktivite indeksi (6), Crohn hastalığı için VanHees ve arkadaşlarınca

Tablo II: Çalışma gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı

Gruplar	Kadın		Erkek		Toplam	
	Sayı	Yaş	Sayı	Yaş	Sayı	Yaş
Üls. kolit	17	37.2817	19	39.1520	36	38.4722
Crohn hastalığı	5	39.2310	6	37.0130	11	38.1818
Kontrol	8	38.0115	9	38.2301	17	38.1765

önerilen indeksleme yöntemi (7) uygulandı. Tüm olgulara tam kan sayımı, hemostaz testleri, Faktör V, Faktör VIII, akut faz reaktanları (kantitatif CRP, haptoglobulin, sedimantasyon hızı, transferrin), biyokimyasal incelemeler, gaitanın bakteriyolojik incelemeleri, ultrasonografik inceleme yapıldı.

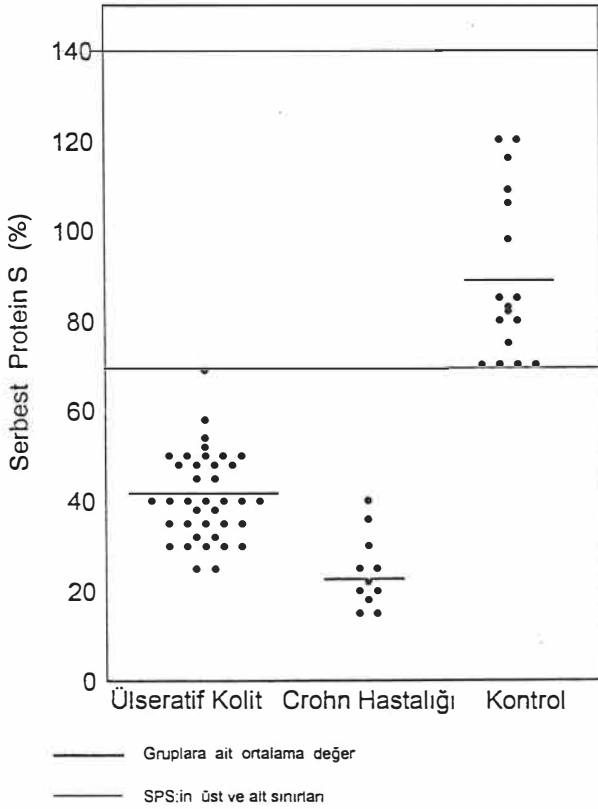
Protein C düzeyleri ELISA yöntemi ile (Thrombonistika Protein C, Boxtel, Holland) Serbest protein S düzeyleri ELISA yöntemi ile (Thrombonostica Protein S, Boxtel, Holland), C4b-BP düzeyleri microlatex photometric immunoassay yöntemi ile (Liatest, C4b-BP, Diagnostica Stago, France) ölçüldü. _statistiksel incelemelerde T testi, Mann-Whitney U testi, Spearman rank korelasyon analizi ve regresyon analizi kullanıldı.

SONUÇLAR

Ülseratif kolit (n=36, 17 K, 19 E), CH (n=11, 5K, 6E) ve kontrol (n=17, 9K, 8E) gruplarında ortalama yaşlar 38.4722 ± 13.7102, 38.1818 ± 14.1762, 38.1765 ± 11.35 olup gruplar arasında yaş ve cinsiyet bakımından fark yoktu (p>0.05).

Hastalık aktivitesi, yaygınlık ve tedavi:

ÜK grubunda hastaların ortalama aktiviteleri 1-10 arasında olup ortalama skor 4.75 ± 2.83 idi. Aktif sınırı kabul edilen 6'nın üzerinde olan 15 olgu (%41) vardı. Klinik aktivite indeksi ortalama 142.3556 idi. Aktivite dağılımı şöyleydi: 10 hasta remisyonda, 12 hastada hafif şiddette, 12 hastada orta şiddette, 2 hastada şiddetli aktivite. Endoskopik ve klinik aktivite indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p<0.001). CH grubunda VanHees indeksi ortalama 129.2817 bulundu. Aktivite dağılımı şöyleydi: 6 olguda hafif, 4 olguda orta derecede, 1 olguda şiddetli inflamatuvar aktivite saptandı.



Şekil 1: Çalışma gruplarında serbest protein S dağılımı

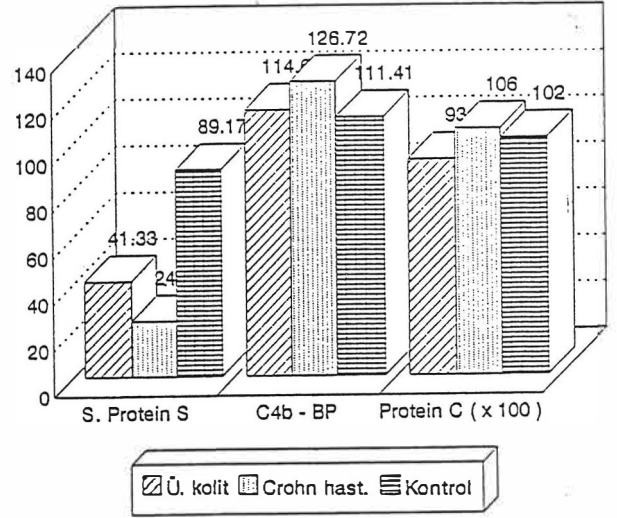
Hastalığın yaygınlığı: ÜK grubunda 5 olguda yaygın, 27 olguda sol kolon tipi, 4 olguda distal tip ÜK saptandı. CH grubunda 6 olguda ince barsak, 5 olguda ince barsak + kolon tutulumu vardı.

Hastalığın süresi: Yedi olguda 5 yıldan fazla, 20 olguda 1-5 yıl, 6 olguda 1 yıldan az ve 2 olguda yeni tespit edilmişti.

Tam kan sayımı bulguları: Ortalama hemoglobin ÜK grubunda 12.46 gr/dl, CH grubunda 12.92 gr/dl, kontrollerde 14.10 gr/dl olup hastalık gruplarında kontrollere göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$). Trombosit sayılarında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Hemostaz testleri: Hemostaz testleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0.05$). Faktör V ve Faktör VIII hastalık gruplarında kontrollere göre daha yüksek olmasına karşın istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Gaita incelemeleri: Olguların gaita incelemelerinde bakteriyel yada paraziter patolojik bulgu saptanmadı.



Şekil 2: Çalışma gruplarında serbest protein S, protein C, C_{4b}-BP ortalama değerleri

Protein C, SPS, C4b-BP: Protein C düzeyleri Tablo II'de gösterildi. Protein C düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0.05$). SPS düzeyleri Tablo II'de gösterilmiştir. SPS, ÜK ve CH gruplarında olguların tümünde normal alt sınır olan %70'in altında, kontrollerde ise normal sınırlar (%70-%140) içinde bulunmuştur (Şekil 1, Şekil 2). İstatistiksel incelemede her iki hastalık grubunda da kontrol grubuna göre daha düşük bulundu ($p < 0.0001$). CH grubunda ÜK grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.001$). SPS düzeyleri ile doğrudan aktivite indeksleri arasında yapılan karşılaştırmada korelasyon saptanmadı ($p > 0.05$). Hasta olguları aktif olanlar-olmayanlar şeklinde ayırdıktan sonra ($n=36$, aktif=indeks $>6=15$, remisyonunda=21) yapılan incelemede yine istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$). Tedavi görenlerle görmeyenler arasında yapılan incelemede ($n=36$, tedavi görenler=22, tedavi görmeyenler=14) fark bulunmadı ($p > 0.05$). C4b-BP düzeyleri tablo II'de gösterildi. Hasta gruplarında kontrollere

Tablo III: Çalışma gruplarında SPS, PC ve C_{4b}-BP düzeyleri

Gruplar	SPS* (%)	PC (IU/ml)	C _{4b} -BP (%)
Üls. kolit	41.33	0.93	114.61
Crohn hastalığı	24.09	1.06	126.72
Kontrol	89.17	1.02	111.41

göre daha yüksek olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

TARTIŞMA

İBH'da tromboembolik olaylar eskiden beri bilinmektedir. Bu birliktelik patogeneizde mikrovasküler trombozise bağlı iskeminin rolü olabileceği düşüncelerinin doğmasına neden olmuştur (8). Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş, hemostaz testlerinde bozulma saptanmış ve bunun inflamasyona bağlı olduğu düşüncesi ağırlık kazanmıştır (9). 1980'lerin sonuna doğru Wakefield tarafından teori tekrar gündeme getirilmiş ve Crohn hastalarının rezeke spesmenlerinde sofistike teknikler kullanılarak inflamasyonun damarlar çevresinde yoğunlaştığı gösterilmiştir (10,11). Mikroküreler kullanılarak yapılan deneysel bir çalışmada akut multifokal gastrointestinal infarktüs oluşturulmuş ve Crohn hastalığında olduğu gibi segmenter barsak inflamasyonu gösterilmiştir (11). Herediter protein C ve protein S eksikliğine bağlı tekrarlayıcı tromboembolizm ile seyirli hastalık tablosunun gösterilmesi, tromboembolik komplikasyonların nadir olmayarak geliştiği İBH'da da bu proteinlerin araştırılmasına neden olmuştur. Tromboembolik komplikasyonu olan İBH'lı olgularda bu proteinlerin düşük olduğu gösterilmiştir (4). İskemik teoride; 1. oklüziv vasküler zedelenme fokal ve muskularis propria içinde yer aldığı için histolojik inceleme için mukozadan alınacak örneklerde vaskülit yakalama olasılığı düşük olacaktır, buna karşın rezeksiyon materyalinde özel teknikler kullanılarak vaskülit gösterilebilir. 2. Deneysel intestinal iske mi ile fokal inflamasyon oluşturulması Crohn hastalığı doğasına uygundur. 3. Crohn hastalığında rezeksiyon sonrası oluşturulan anastomoz bölgesinde erken nüks oluşumu, bu bölgedeki yetersiz vasküler yapılanmanın zaten var olan iske miye yatkınlığı daha da artırmasına bağlı olabilir (12). Crohn'da oluşan striktür formasyonu iskemik intestinal zedelenmenin bir karakteristiğidir (12). 4. Crohn hastalığında feçesin ileostomi ile distale ulaştırılmaması remisyona neden olmakta, feçes transitinin tekrar normale döndürülmesi ise aktivasyona neden olmaktadır (13). Bu olayın nedeni barsakta feçes bulunması ile oksijen gereksiniminin artmasına bağlı olabilir (12). 5. Nikotin ve oral kontraseptiflerin şiddetli aktivasyon ile bir-

likteliği bunların trombozisi artırıcı etkileri ile ilgili olsa gerektir. 6. Tromboembolik komplikasyon nedeniyle heparin tedavisi gören (kanlı diyareye rağmen) ve kısa sürede remisyona giren olgular bildirilmiştir (14)

İskemik teori, inflamasyona öncelik eden vaskülit nedenini ise endotel ile immün hücrelerin intravasküler hemostaz dengelerinin bozulması ile açıklamaktadır (12). İntestinal endotel ve periferik mononükleer hücreler arasında antikoagülan aktivitenin baskın olduğu bir denge mevcuttur (15). Bu denge mikroorganizma gibi bir uyarı etkisi ile mononükleer hücreler aracılığıyla koagülan aktivite lehine bozulur. Bu koagülasyonun başlatıcıları doku faktörü (tromboplastin), faktör VII, ve protrombinazdır (16). Selüler prokoagülan yol, hücre sel immünitenin önemli bir kolunu oluşturur. Helper T lenfositlerin stimüle ettiği ve lenfokinlerin aracılık ettiği monosit aktivasyonu ile bu hücrelerden salınan doku faktörü (MTF-monosit doku faktörü), IL-1 ve TNF hem doğrudan koagülasyonu uyarmakta hem de monosit ve endotelden doku faktörü salınmasına neden olmaktadır. Ayrıca endotelden de sitokinler salınmaktadır. Crohn'lu hastalarda var olduğu iddia edilen prokoagülan aktivite (AT-III, doku plazminojen aktivatörü ve monosit prokoagülan aktivite yanında (12) immün bir uyarı (mikroorganizma vb.) iskemik teorinin dayandığı başlatıcı mekanizma olarak kabul edilmektedir. Özet olarak bu teori inflamasyonun, immün bazı mekanizmalarla lokal olarak intravasküler koagülasyonun başlamasını, mikrovasküler trombozise bağlı iske mi/reperfüzyon injurisi sonucu doku hasarının oluşmasını öngörür. Lokal olarak başlayan bu olay endotelde harabiyet, geçirgenlik artışı ve intraluminal antijenlerin dokuya geçerek immün reaksiyonlarla olayın şiddetlenmesine ve kronikleşmesine yol açabilir.

Çalışmamızda SPS hasta olguların hepsinde de normal sınırın altında bulunmuştur. Kontrol olgularının hiçbirisinde de normalden düşük olmaması laboratuvar hatası olasılığını ekarte ettirmektedir. Söz konusu düşüklük istatistiksel olarak çok anlamlıdır ($p<0.0001$). Her iki hasta grubunda da hastalık aktivitesi ile korelasyon bulunamamıştır. Protein S ile yapılan çalışmalarda SLE, lösemi, kronik DIC gibi hastalıklarda bu protein düzeyindeki düşüklüğün karaciğer

fonksiyon bozukluğuna, serbest/bağlı protein S oranındaki değişmeye ve C4b - BP artışına bağlı olduğunu göstermiştir (17). Bizim olgularımızda karaciğer fonksiyonları normal bulunmuştur. Hastalık aktivitesi ile korelasyon bulunmaması tüketim artışına sekonder bir düşme olasılığından uzaklaştırmaktadır. Protein S'in %60'ı serumda kompleman sistemine ait bir protein olan C4b - BP'e bağlanır. Akut inflamatuvar olaylarda C4b - BP düzeyinde artışa bağlı olarak serbest fraksiyonun düşeceği bildirilmiştir (18). Çalışmamızda C4b - BP düzeyleri İBH gruplarında, kontrol grubuna göre hafif yüksek bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark anlamlı değildir. Bu bulgular SPS düşüklüğünün C4b - BP artışına bağlı olmadığını göstermektedir.

SPS düzeylerinin İBH'da kontrollere göre anlamlı olarak düşük bulunmasının primer bir dü-

şüklüğe mi bağlı olduğu, yoksa inflamasyona sekonder mi olduğunu kesin olarak söylemek zordur. SPS düzeylerinin hastalık aktivitesi ile korele olmaması inflamasyona bağlı sekonder düşme olasılığını azaltmaktadır. Kronik inflamatuvar olaylarda SPS düzeyleri konusunda elimizde yeterli veri yoktur. Kesin olarak bilinen, kronik inflamatuvar olaylarda protein S'in bağlandığı C4b-BP düzeyinde artış olduğudur. Çalışmamızda C4b-BP hasta gruplarında kontrollere göre daha yüksek olmakla birlikte bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Oysa SPS düşüklüğü istatistiksel olarak çok anlamlıdır ($p<0.0001$). Elde ettiğimiz bu bulgunun İBH patogenezindeki anlamını yorumlayabilmek için bu konuda yeni çalışmalar yapılmasının yararlı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Stenson WF, MacDermott RP. Inflammatory bowel disease in: Yamada T, Alpers DH, Owyang C, et al. Textbook of Gastroenterology-volume two. 1991, J. B. Lippincott comp. Philadelphia. p.1588-89.
2. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. N Eng J Med 1986, 314: 1298-1303.
3. Kessler CM, Strickland DK. Protein C and protein S clinical perspectives. Clinica Chimica Acta 1987, 25-36
4. High KA. Antithrombin III, protein C, and protein S. Arch Pathol Lab Med 1988, 112: 28-36.
5. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial. BMJ 1989, 82-86.
6. Seo M, Okada M, Yao T, Ueki M, Arima S, Okumuro M. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. Am J Gastroenterol 1992, 87: 971-76.
7. Van Hees PAM, Van Elteren PH, Van Lier HJJ, Van Tongeren JHM. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. Gut 1980, 21: 279-86.
8. Knutson H, Lunderquist An, Lunderquist Al. Vascular changes in Crohn's disease. AJR 103(2): 380-85
9. Knot EAR, Tencate JW, Leeksa OC, Tytgat GN, Vreeken J. No evidence for prethrombotic state in stable chronic inflammatory bowel disease. J Clin Pathol 1983, 36: 1387-90.
10. Brinberg DA, Stefansson TB, Greicius FA, Kahlam SS, Molin C. Portal vein thrombosis in Crohn's disease. Gastrointest Radiol 1991, 16: 245-47.
11. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyerr AM, More L, Sim R, et al. Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. Gastroenterology 1991, 100: 1279-87.
12. Hudson M, Piasecki C, Sankey EA, Sim R, Wakefield AJ, More LJ, Sawyerr AFM, Dhillon AP, Pounder RE. A ferret model of acute multifocal gastrointestinal infarction. Gastroenterology 1992, 102: 1591-96.
13. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AAM. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. Lancet, 1989, ii:1057-62
14. Harper PH. Split ileostomy and ileocolostomy for Crohn's disease of the colon and the ulcerative colitis. A 20 years survey. Gut 1983, 24: 106-13.
15. Gaffney PR, O'Leary JJ, Doyle CT, Hogan J, Smew F, Annis P. Response to heparin in patients with ulcerative colitis. Lancet 1991, 337:238-39
16. Pober JS. Cytokine-mediated activation of the vascular endothelium. Am J Pathol 1988, 133: 426-33.
17. Edwards RL, Levine JB, Green R, Duffy M, Mathews E, Brande W, Rickles FR. Activation of blood coagulation in Crohn's disease. Gastroenterology 1987, 92: 329-37.
18. D'Angelo A, D'Angelo SV, Esmon CT, Comp PC. Acquired deficiencies of protein S J Clin Invest 1988, 81: 1445-54.
19. Nishioka J, Suzuki K. Inhibition of cofactor activity of protein S by a complex of protein S and C4b-binding protein. J Biol Chem 1990, 9072-76.