

MH Pécsi Honvédkórház Belgyógyászati Osztály,
POTE I. Belgyógyászati Klinika*

Vérlemezke funkció, aktiváltsági állapot és vWF Ag szint vizsgálata inaktív Crohn betegekben

Dr. Simon Higin orvosalezredes
Dr. Kecskés Marianna*

Közlésre érkezett: 1999. július 1.

Kulcsszavak: Crohn betegség, vérlemezke, aggregáció, VWF Ag, PAF, TNF α ,
5 ASA

Rövidítések:

CD= Crohn disease, CU= Colitis ulcerosa, PAF=Platet Activating Factor,
TNF α =Tumor Necrosis Factor alfa, IL-1=Interleukin-1, IBD=Inflammatory Bowel
Disease, CDAI=Crohn Disease Activity Index, vWF Ag=von Willebrand Factor
Antigen, 5 ASA= 5 amino-salicyl-acid.

A Crohn betegség etiológiájában az eddig ismert tényezők mellett a vascularis faktorok (thrombocytosis, granulomatous arteriitis thrombotikus okklúzióval és okklúzió nélkül) is szerepelnek. A szerzők tíz, jelenleg inaktív, 5 ASA fenntartó kezelésben részesülő Crohn betegben a vascularis faktorok közül a vérlemezke funkciót és a von Willebrand faktor Ag szintjét vizsgálták. Ebben a Crohn beteg csoportban korábban spontán vérlemezke aggregációt találtak, betegségük aktivitása idején. A vérlemezke funkciót (aggregáció, ATP release) és a vérlemezkek aktiváltsági állapotát normálisnak találták, amit flow cytometriával is ellenőrizték. A plazma vWF Ag szintje sem volt eltérő a normális értékekhez képest. Az eredményeik alapján olyan mértékű vascularis károsító mechanizmus nem igazolható amely ezen perifériás vénás vérmintából detektálható paraméterek eltérését okozná. Magyarán az 5 ASA tartós szedése, a betegség inaktivitása is feltételezhető. Ezen vizsgálatokat gyógyszeresen még nem kezelt Crohn betegekben, illetve az eddig vizsgált betegeknel aktív stádiumban kívánják elvégezni.

Az ileitis regionalis etiológiája Crohn 1932-es leírása óta sem tisztázott. A gyulladáshoz vezető bélbetegség (IBD) multifaktoriális betegség. A genetikai hajlam és a külső környezeti tényezők

együttesen vezetnek a betegség kialakulásához. Az utóbbi időben előtérbe került a vascularis faktorok lehetséges szerepe. Talstad 1973-ban írta le colitis ulcerosában és vastagbél

betegek vizsgálatok	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
TCT szám (PRP-ből)	720	580	620	640	600	640	540	600	640	600
ADP% (10uM)	90,0	90,0	75,0	90,0	77,5	97,5	92,5	90,0	75,0	80,0
Release (nmol)	1,38	1,1	1,1	1,28	1,23	1,5	1,05	1,3	1,02	0,5
Adrenalin% (10uM)	100	92,5	92,5	90,0	94,0	95,0	95,0	90,0	90,0	95,5
Release (nmol)	1,42	1,1	1,5	1,41	1,34	1,61	1,52	1,58	1,55	1,4
Collagen% (2ug/ml)	81,2	87,5	82,5	82,5	90,0	92,5	97,5	90,0	75,0	87,5
Release (nmol)	1,28	0,9	1,52	1,41	1,68	0,95	1,54	1,58	1,54	1,4
Spontán% (5 percben)	3,75	2,5	3,75	3,75	0,0	6,25	5,0	5,0	5,0	0,0

I. táblázat

Vérlemezke funkciós vizsgálatok eredményei

manifesztációjú Crohn betegségben a thrombocytosis, ahol a vérlemezke szám emelkedése a betegség aktivitásának a jele (26). A vascularis eredetre utal a dohányzás (17) és a fogamzásgátló (22) károsító szerepe CD-ben, heparin kezelés effektivitása CU-ban (11), az IBD-t kísérő thromboemboliák, A és B hemophilia, illetve von Willebrand betegségben rendkívül alacsony IBD incidencia (28). A vWF Ag-nek szerepe van a vérlemezke aggregációban, szintjét érfa károsításban emelkedettnek találták (2). Wakefield multiplex gastrointestinalis infarctusok esetén granulomatosus arteriitist talált, thrombotikus okklúzióval és okklúzió nélkül is (319). A vérlemezke aktiváló

faktor szintje CD-ben magasabb (8). Gonzalez-Crussi 1983-ban PAF adásával ischemiás bélnekrózist idézett elő modell kísérletben (12). A PAF vasoconstrictor hatása másodlagosan a leukotrien C4 és norepinephrin termelés indukcióján keresztül jön létre (16).

Beteganyag és módszerek

Betegek

Tíz, jelenleg inaktív Crohn beteget vizsgáltuk, 4 férfit és 6 nőt, akiknél korábban, betegségük aktivitása idején spontán vérlemezke aggregációt találtunk. Életkoruk 23–44 év között volt, átlag életkor 31,8 év. A tíz Crohn betegnél 3 vékonybél, 1 vastagbél és

Harvey-Bradshaw index

A. Általános állapot	(0=nagyon jó, 1=jó, 2=rossz, 3=nagyon rossz, 4=elviselhetetlen)
B. Hasi fájdalom	(0=nincs, 1=enyhe, 3=közepes, 4=súlyos)
C. Széklet	laza székletek száma/nap
D. Tapintható rezisztencia	(0=nincs, 1=bizonytalan, 2=van, 3=van és tapintható)
E. Komplikáció	arthalgia, uveitis, erythaemia nodosum, aphtosus fekély, pyoderma gangrenosum, analis fissura, új fistula, abscessus. (1egység=1 pont)

II. táblázat:*Crohn betegség aktivitási indexe (CDAI)*

6 kettős lokalizáció volt. Három betegnek volt fisztulája. A betegség aktivitásának megítélésére a *Harvey-Bradshaw* CDAI indexet használtuk. Betegeinknél az index <5 pont (II. táblázat) (14). Hat betegnél sebészeti beavatkozás történt. Szövettani vizsgálat 8 esetben granuloma pozitív, 2 esetben a gyulladásos jelek mellett granulomát kimutatni nem sikerült. A szövettani képen perivascularis gyulladás, sokszor pangás és sludge is látható. A betegek szteroid kezelést követően 5 ASA fenntartó terápiaiban részesültek.

Vizsgálati módszerek

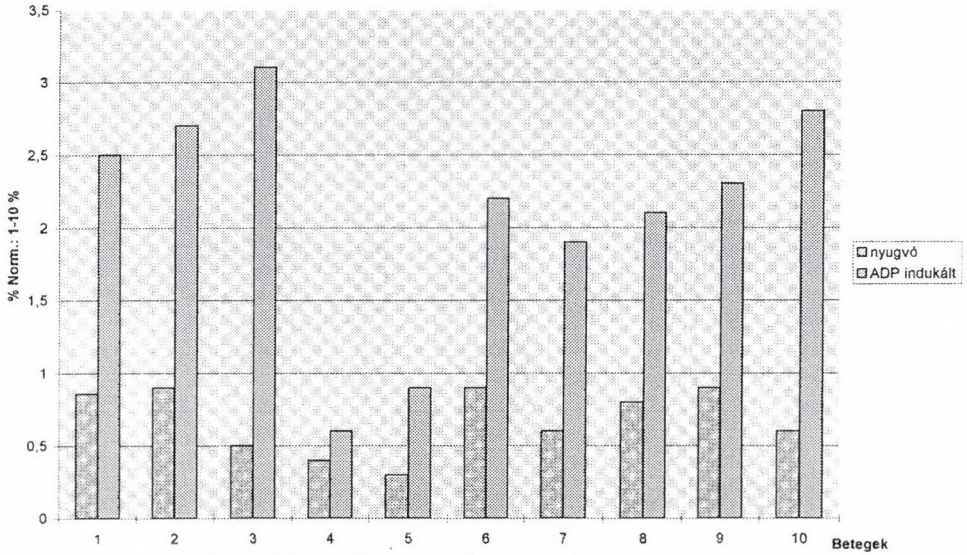
A vizsgálatokat a POTE I. sz. Belgyógyászati Klinika Véralvadási Laboratóriumában végeztük. Cubitalis vénából nyert vért citráttal antikoaguláltuk, 1000 rpm 5 min. centrifugálással PRP-t nyertünk, amelyből ADP, Adrenalin, Collagen indukált aggregációt és ATP release-t végeztük. Aggregáció ADP 10 mMol, Adrenalin 10 mMol, Collagén 2 mg/ml végkoncentráció indukált. ATP release: Luciferin Luciferase reagenst használtuk.

Vérlemezke aggregációs és ATP release vizsgálatokat *Chrono-log* lumi-aggregometerrel végeztük.

A vérlemezke aktiváltsági állapotának vizsgálata K3 EDTA antikoagulált vénás vérből, aktiváció specifikus monoklonális ellenanyagokkal, kettős jelöléssel (CD61-FITC, CD62PE), *Becton Dickinson* FACScan flow-cytometerrel történt. A CD62 PE= α granulum 140kDA membrán protein elleni, CD61-FITC=GPIIIa-nyugvó kontroll kijelölésére szolgált. K3 EDTA – vénás vért 1% PFA-al fixáltuk a vérlemezkeket, a vérvételt követő 1 percen belül a spontán aktiválódás elkerülésére, majd mosás után jelöltük. Az aktivált vérlemezkek százalékos arányát határoztuk meg. Az érfal károsodás megítélésére vWFAg szint meghatározást alkalmaztunk. Citrátos vérből 1% agaróz gélen rakéta immun elektroforézissel végeztük. A standard human plazma *Bechring* gyártmányú volt.

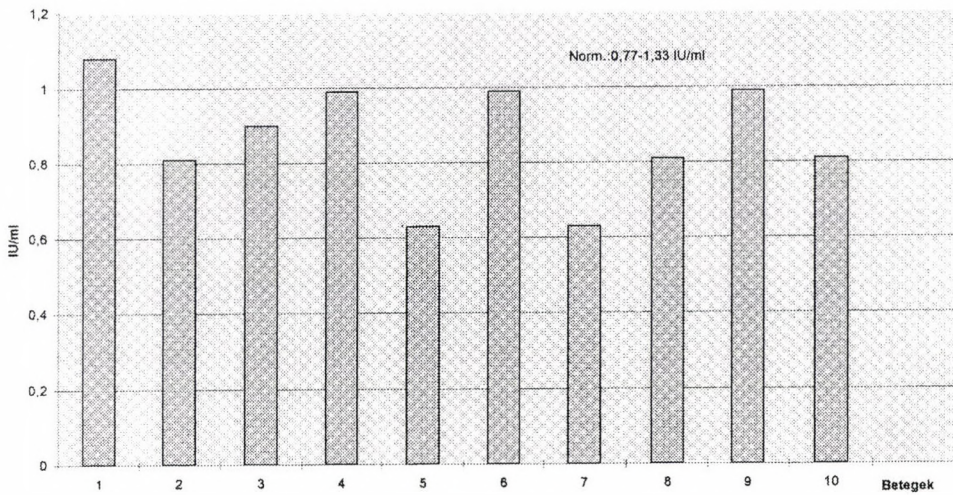
Eredmények

A vérlemezke funkcionális állapotá-



1. ábra:

Aktivált vérlemezkék százalékos aránya flow-cytometriával



2. ábra:

vWF Ag szintje inaktív Crohn betegekben

PAF hatásai:
<ul style="list-style-type: none"> – aktiválja a neutrophileket és vérlemezkéket – aggregációt és chemotaxist fokozza – érfal permeabilitást fokozza – IL-1 szintjét emeli – ischaemiát (hipoxián keresztül) okoz – ulcerogen hatású
PAF szintjét emeli:
TNF alfa IL-1 Histamin bakteriális termékek (FMLP, K235 endotoxin)

III. táblázat:

A PAF hatásai és termelését indukáló anyagok

Cytoadhesinek szintjét emeli:
IL-1 TNF alfa gamma INF
5 ASA hatásai:
PAF szintetase gátlása cyclooxygenase gátlása (prostaglandinok) lipoxigenase gátlása (leukotrinek) IL-1 termelés szintjének csökkentése a plazma sejtek immunglobulin termelésének csökkentése

IV. táblázat:

A cytoadhesinek induktorai és az 5 ASA hatásai

nak megítélésére induktorkal kiváltott aggregációs és ATP release vizsgálatok abnormalitást nem igazoltak (I. táblázat). A flow-cytometria hűen modellálja az *in vivo* körülményeket, kettős jelöléssel lehetővé válik a vérlemezke populáció kijelölése, amelyen belül az aktivált vérlemezkék elkülönítése is. A flow-cytometriás vizsgálatok nem mutattak kóros aktivitást az elvégzett esetekben, ahol induktorkal normális aktiválhatóság volt igazolható (1. ábra). A meghatározott vWF Ag szintek nem tértek el a normális értéktől (2. ábra).

Megbeszélés

A CD kialakulásában vascularis faktorok is szóba jönnek. A PAF, Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF α), Interleukin-1 (IL1), interferon gamma (INF γ) hatásait a Crohn betegség patogenezisében több közleményben is

leírták. A PAF fontos szerepet játszik a CD patogenezisében (24). A PAF nem raktározódik, hanem indukcióra gyorsan szintetizálódik. Indukáló faktorokat a III. táblázat mutatja. A PAF okozta érfal károsodására utalhat a CD-ben magasabb vWF Ag szint. TNF α okozta károsodás PAF antagonistával kivédhető (24), ami azt jelenti, hogy a TNF α fokozza a PAF szintézisét, így a hatása is PAF-on keresztül érvényesül. TNF α inaktív CD-ben normális szinten van. Az IL1, mint az immunválasz kulcsmediátora, a prostaglandin és leukotrinek szintjét növeli (3). A TNF α és a INF γ lenne felelős a granuloma képződésért. Vizsgálatainkat 5 ASA-t szedő CD betegekben végeztük, így az 5 ASA hatását ezen folyamatoknál figyelembe kell venni (IV. táblázat). Az 5 ASA a PAF szintetázon keresztül csökkenti a PAF szintjét, így a vérlemezke aggregáció mértékét is. Az 5

ASA az IL1 termelését szintén csökkenti. Az IL1 és TNFa szintjének csökkenése, cytoadhesinek expressziója alacsonyabb, ami a vérlemezkék adhézióját csökkenti.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy a vascularis etiológiai faktorok szerepét feltételezve megvizsgáljunk CD-ben, olyan véralvadási paramétereket, amelyek kiterjedtebb endothel károsító hatás jelenlétére érzékenyen reagálnak. Vérlemezke funkciót (aggregáció, ATP release), aktiváltsági állapotot és a vWFAG szintet vizsgáltuk a vascularis faktorok közül, olyan betegekben, akiknél betegségük korábbi aktivitása esetén 10–44% spontán vérlemezke aggregációt mutattak.

A vizsgálatok idején a betegek inaktív állapotban voltak. A tíz inaktív, 5 ASA-szedő *Crohn* betegben az általunk mért paramétereket normálisnak találtuk. Az 5 ASA hatása összetett formában feltehetően normalizálja az általunk vizsgált vascularis faktorokat, illetve a betegség inaktivitása is szóba jön. Ennek tisztázására a továbbiakban ezen vizsgálatokat egyrésztől gyógyszeresen még nem kezelt CD betegekben, másrésztől az eddig vizsgált betegcsoport esetén, betegségük aktiválódása idején elvégezzük, az ismertetett módszerekkel. A két vizsgálat eredményét összehasonlíthatjuk, pozitivitás esetén eredményeinket közöljük.

IRODALOM

1. *Abrams, C. and Shattil, S. J.*: Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thrombosis Haemostasis*. 1990, 65: 467–473.
2. *Blann A.D., McCollum C.N., Waite M., Balment R.*: Raised levels of von Willebrand factor antigen (vWFAG) may indicate injury to the endothelium in hypertension in man rat. *J. Physiol*, 1991, 435: 30
3. *Braegger, C.P., MacDonald, T. T.*: Immune mechanism in chronic inflammatory bowel disease. *Ann. Allergy*, 1994, 72: 135–141.
4. *British Society for Haematology Guidelines: Guidelines on platelet function testing. J Clin. Pathol*, 1988, 41: 1322–1330.
5. *Crohn, B. B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G. D.*: Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *J. Am. Med. As*, 1932. 99: 1323.
6. *David J. C. Shearman Niall D. C. Finlayson:* Diseases of the Gastrointestinal Tract and Liver. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1989.
7. *Denizot, Y., Chaussade, S. Nathan, N., Colombel, J. F., Bossant, H. J., Cheronki, N., Benveniste, J., Coutuier, D.*: PAF-acether and acetylhydrose in stool of patient with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 1992, 37: 432–437.
8. *Eliakim, R., Karmeli, F., Razin, E., Rachmilewitz, D.*: Role of platelet-activating factor in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine and prednisolone. *Gastroenterology*, 1988, 95: 1167–1172.
9. *Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G., Riddel, R.*: Experimental model of IBD. *Gastroenterology*, 1995, 109: 134–1367.

10. *Furie B. and Furie B. C.*: Molecular and cellular biology of blood coagulation New England Journal of Medicine, 1992, 326: 800–806.
11. *Gaffney, P. R, Cuimin, T. D., Gaffney, A., Hogan, J., Hayes D. P., Annis P.*: Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol*, 1995, 345: 220–223.
12. *Gonzalez-Crussi, F, Hseuh, W.*: Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet activating factor and endotoxin. *A.M.J. Pathol.*, 1983, 112: 127–135.
13. *Hanauer, S. B.*: Inflammatory bowel disease. *New England J. Med.*, 1966, 334: 841–847.
14. *Harvay, R. F., Bradshaw, J. M.*: A simple index of *Crohn's* disease activity. *Lancet*, 1980, 1: 514.
15. *Hoffbarnd-Pettit*: A klinikai haematológia alapjai, Spinger Hungarica Kiadó Kft., 1997.
16. *Hsueh, W., Gonzalez-Crussi, F, Arroyave, J.L.*: Sequential release of leukotrienes and norepinephrine in rat bowel after platelet activating factor, a mechanistic study of platelet activating factor-induced bowel necrosis. *Gastroenterology*, 1988, 94: 1412–1418.
17. *Jarnerot, G.*: Future aspects on inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterology*, 1996, 31. suppl. 220: 87–90.
18. *Kald, B., Olaison, G., Sjudahl, R Tagesson, C.*: Novel aspect of *Crohn's* disease: Increased content of platelet an activating factor in ileal and colonic mucosa. *Digestion*, 1990, 46: 199–204.
19. *K.H. Meyerrzum Büschenfelde, G. Paumgartner, J. Schölmerich*: Perspectives in Gastroenterology, Current Facts and Future Trends. Urban and Schwarzenberg, 1995.
20. *Kovács Ágota*: A vastagbél gyulladásoos betegségek. Medicina, Budapest, 1986.
21. *Lindberg, E., Jarnerot, G. Huitfeld B.*: Smoking and *Crohn*-disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*, 1992, 33: 779–782.
22. *Perlon, P.G, Leijonmarck, C. E, Bernell, Hellers, G., Ahlholm, A.*: Risk indicators for inflammatory bowel disease. *Int. J. Epidemiol.* 1993, 22: 268–272.
23. *Singelton, J. W., Hanauer, S. B., Gitnick G. L., Peppercorn, M. A., Robinson, M. G., Wruble, L. D., Krawitt, E. L.* and the Pentasa *Crohn's* Disease Study Group: Mesalazine capsules for the treatment of active *crohn's* disease: Results of a 16-Week Trial. *Gastroneterology*, 1993, 104: 1293–1301.
24. *Stenson, W.F.*: Platelet-activating factor and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1988, 95: 416–421.
25. *Stevens, C., Wallz, G., Singaram, C., Lipman, M. L., Zanker, B., Muggia A., Antonioli., Peppercorn, M.A., Strom, T.B.*: Tumor necrosis factor α , interleukin 1b and interleukin -6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig. Disease and Sciences*. 1992, 37: 818–826.
26. *Talstad, L., Rootwelt, K. & Glone, E.*: Thrombocytosis in ulcerative colitis and *Crohn's* disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1973, 8: 135.
27. *Thomson, N.P., Wkaefiled, A.J., Pounder, R.E.*: Inherited disorders of coagulation appear against inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1995, 108: 1011–10115.
28. *Tuddenham E. G. D.*: Von Willebrand's factor and its disorders: An overview of recent molecular studies. *Blood Reviews*, 1989, 3: 251–262.
29. *Vessey, M., Jewell, D., Samith, A., Yates, D., McPherson, K.*: Chronic inflammatory bowel disease, cigarette smoking and use of oral contraceptives: findings in large cohort study of women of child-bearing age. *Br. Med. J.*, 1986, 292: 1101–1103.
30. *Wallace, J. L.*: Release of platelet activating factor (PAF) and accelerated healing induced by PAF antagonist in animal model of chronic colitis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1988, 66: 422–425.
31. *Wakefeld, A. J., Sankey, E., Dhillon, A. P.* Granulomatous vasculitis in *Crohn's* disease. *Gastroenterology*, 1991, 100: 1279–1287.

Lt.Col. H. Simon M.D.M.C.
Marianna Kecskés M.D.

Function of platelet and vWFAg level in case of inactive Crohn's disease

In the etiology of *Crohn's* disease vascular factors (thrombocytosis, granulomatous arteritis with thrombotic occlusion or without occlusion) play role as well. The authors examined the functions of platelet and the level of vWFAg – out of vascular factor – in ten patients with inactive *Crohn's* disease who have been treated with long term 5 ASA. In this group of patients when their disease was active, spontaneous platelet aggregation was detected. The function of platelet (agg-

regation ATP release) and the activity of the platelet were normal which was controlled by flow-cytometry. The level of vWFAg of the plasma was normal. According to the results such a damaging vascular mechanism which may cause the deviation of parameters detected in the cubital vein's blood sample cannot be justified. It can be explained by the long-term 5 ASA treatment and the inactive *Crohn's* disease. These methods are planned to be carried out in the case of those patients with *Crohn's* disease who have not yet been treated, and whose *Crohn's* disease is active.

Dr. Simon Higin o.alez.
7636 Pécs, Polgárszőlő u. 3.