

A paraoxonázaktivitás vizsgálata kevert kötőszöveti betegségben

Bodolay Edit, Seres Ildikó, Jakab Zsanett, Csípő István, Szilágyi Anna, Szegedi Gyula, Paragh György

BEVEZETÉS – A kevert kötőszöveti betegség több szervet érintő gyulladásos autoimmun kórkép. Az immunoinflammatorikus folyamatok jelentős szerepet játszanak az atherosclerosis patogenezisében. Kevert kötőszöveti betegségben még nem vizsgálták a gyulladásos paraméterek és az atherosclerosis kapcsolatát. Az atherosclerosis egyik fontos rizikótényezője a lipidabnormalitás. A lipidek közül a HDL véd az atherosclerosis szemben. E védőhatás egyik letéteményese az antioxidáns hatású paraoxonáz. Munkánkban néztük a lipidprofil és a paraoxonázaktivitást, és vizsgáltuk az észlelt eltérések hátterében szerepet játszó tényezőket.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK – A vizsgálatba 37, kevert kötőszöveti betegségben szenvedő beteget vontunk be, akik a vizsgálatot megelőző két hónapban lipidcsökkentő kezelésben nem részesültek. Az adatokat 30 egészséges kontrollszemély értékeihez hasonlítottuk. A 37 beteg életkora a vizsgálatkor átlagosan $51,2 \pm 9,5$ év volt, betegségük fennállása átlagosan $11,0 \pm 7,2$ év. A paraoxonázaktivitást spektrofotometriával mértük. A lipidprofil mérése Cobas Integra 700 Analizátorral történt. A von Willebrand-faktor-antigén meghatározását thrombocytaszegény plazmából immunturbidimetriás meghatározással végeztük, a trombomodulin, az endothelsejt elleni antitest meghatározása ELISA-módszerrel történt.

EREDMÉNYEK – A kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek paraoxonázaktivitása átlagosan kisebb volt, mint a kontrollcsoportban (MCTD: $118,5 \pm 64,6$ U/l, kontroll: $188,0 \pm 77,6$; $p < 0,001$). Szignifikánsan csökkent a betegek arilészterázaktivitása is ($p < 0,001$). A paraoxonázaktivitás csökkenése összefüggött a betegek életkorával, a betegség tartamával, a vascularis (szemészeti, cardialis és cerebralis) eltérésekkel. A betegek összkoleszterin- és -trigliceridszintje szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollcsoportban, az apoA1-szintben viszont csökkenést észleltünk. A csökkent paraoxonázaktivitás és az endothelsejt-aktivációs markerek (trombomodulin, von Willebrand-faktor-antigén, endothelsejt elleni antitest) emelkedése között igen erős korrelációt észleltünk. Nem találtunk összefüggést a szteroidot tartósan szedő és nem szedő betegek értékei között.

STUDY OF PARAOXONASE ACTIVITY IN MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASE

INTRODUCTION – Mixed connective tissue disease (MCTD) is an inflammatory autoimmune disease with multiple organ involvement. Immune-inflammatory processes play a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis. The connection between inflammatory parameters and atherosclerosis in MCTD has not yet been studied. Lipid abnormality is an important risk factor of atherosclerosis. Among the lipids, HDL is protective, which is in part due to the antioxidant effect of paraoxonase. In this paper, the lipid profiles and paraoxonase activities of MCTD patients were studied and the factors causing abnormalities were investigated.

PATIENTS AND METHODS – Thirty-seven patients with MCTD, who had not taken any lipid lowering drugs in the past 2 months, were enrolled in the study. Thirty healthy individuals served as controls. At the time of the study the mean age of the MCTD patients was 51.2 ± 9.5 years, and the mean disease duration was 11.0 ± 7.2 years. Paraoxonase activity was determined by spectrophotometry, lipid profiles were determined by a Cobas Integra 700 Analyser, the von Willebrand factor antigen (vWFag) was measured by turbidimetry in platelet-poor plasma and the thrombomodulin and anti-endothelial cell antibody (AECA) measurements were carried out by ELISA methods.

RESULTS – Paraoxonase activity in the MCTD patients was lower than in the control population (118.5 ± 64.6 U/l vs. 188.0 ± 77.6 , $p < 0.001$). The arylesterase activity was also significantly lower in the patients ($p < 0.001$). The reduction of paraoxonase activity was in correlation with the age of the patients, the duration of the disease and with vascular (eye, cardiac, cerebral) disorders. The total cholesterol and triglycerid levels of the patients were significantly increased compared to the control group, while in the apoA1 levels a significant reduction was seen. A very strong correlation was observed between the reduction of paraoxonase activity and the increase of endothelial cell activation markers (thrombomodulin, vWFag, AECA). There was no difference in the values of patients with or without corticosteroid treatment.

KÖVETKEZTETÉS – Az eredmények arra utalnak, hogy a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek körében fokozott az atherosclerosis-hajlam. Az atherosclerosis kialakulásában a koleszterin- és trigliceridszint-emelkedésen kívül szerepet játszhat a HDL-koleszterinhez kötött antioxidáns, a paraoxonáz csökkent aktivitása és mennyisége. Ezért a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegeknél a fokozott oxidatív folyamatok eredményeként képződő szabad gyökök eliminálása csökkent, ez súlyosbíthatja és fenntarthatja az endothelsejt-károsodást, amelyet jelez az endothelsejt-aktivációt jelző trombomodulin, a von Willebrand-faktor-antigén és az endothelsejt elleni antitest szintjének emelkedése is.

kevert kötőszöveti betegség, paraoxonáz, lipidszintek, érszövődmények

CONCLUSIONS – The results suggest that in MCTD there is an increased risk for atherosclerosis. Apart from an elevated cholesterol and triglycerid level, a reduced paraoxonase level and activity may also play a role in the development of atherosclerosis. Therefore, in patients with MCTD, due to the increased oxidative processes and the impaired elimination of free radicals, a sustained damage to the endothelial cells occurs, which is indicated by increased levels of thrombomodulin, vWFAg, and anti-endothelial antibody.

mixed connective tissue disease, paraoxonase, lipid levels, vascular damage

dr. Bodolay Edit (levelező szerző/correspondent), dr. Csípő István, Szilágyi Anna:
Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,
III. Sz. Belgyógyászati Klinika/University of Debrecen, Medical and Health Science Centre,
3rd Department of Internal Medicine,
H-4004 Debrecen, Pf. 3. E-mail: bodolai@iibbel.dote.hu
dr. Szegedi Gyula: Magyar Tudományos Akadémia-Debreceni Egyetem,
Autoimmun Kórképek Kutatócsoport, Klinikai Immunológiai és Allergológiai Koordináló
Intézet/Research Group of Autoimmune Diseases, Hungarian Academy of Sciences,
Department of Coordination on Clinical Immunology and Allergology, Debrecen
dr. Seres Ildikó, Jakab Zsanett, dr. Paragh György: Debreceni Egyetem,
Orvos- és Egészségtudományi Centrum, I. Sz. Belgyógyászati Klinika/University of Debrecen,
Medical and Health Science Centre, 1st Department of Internal Medicine; Debrecen

Érkezett: 2006. március 20.

Elfogadva: 2006. augusztus 8.

A poliszisztémás autoimmun kórképek, a szisztémás lupus erythematosus, a rheumatoid arthritis, a szisztémás vasculitisek jelenleg előtérben álló vizsgálati területe az atherosclerosis és az atherosclerosis elleni védelem (1–4). Szisztémás lupus erythematosusban a koszorúér-betegségek okozta halálozás 30%-a az összes, szisztémás lupus erythematosusban bekövetkező halálnak (5, 6). Az elmúlt évek vizsgálatai egyértelműen bizonyították, hogy szisztémás autoimmun kórképekben az érrendszer károsodásáért azok a tényezők felelősek, amelyek az atherosclerosis patofiziológiájában is ismertek: a szisztémás autoimmun kórképben szenvedő betegek szérumában magas a proinflammatoricus citokinek – TNF- α , interleukin-1 (IL-1) – szintje (7). Az endothelsejt-felszíni adhéziós molekulák lokális megjelenése elősegíti a keringésből a granulocyták, monocyták átjutását a szövetekbe, és az oxidatív módon módosult LDL a szöveti macrophagok scavenger receptorán keresztül fokozza a habos sejtek képződését, és elősegíti az atherosclerosis korai és gyors kialakulását (8).

A gyulladás mellett a dyslipoproteinaemia az egyik legsúlyosabb rizikófaktor a szisztémás autoimmun kórképekben észlelt, korai életkorban kezdődő atherosclerosis létrejöttében. A magas denzitású lipoprotein (HDL) több módon is véd az atherosclerosis szemben. Az egyik funkciója, hogy a reverz koleszterin-

transzporton keresztül a szövetekből a felesleges koleszterint elszállítja, a másik feladata az antiatherogen funkció. A HDL a májban termelődő paraoxonáz enzim az Apo1-en keresztül megkötö, és gátolja az LDL-oxidációt (9, 10).

A kevert kötőszöveti betegség (MCTD) krónikus gyulladással járó poliszisztémás autoimmun kórkép (11–14). A betegségre jellemző tünettársulás: Raynaud-jelenség, polyarthritis, puffadt, duzzadt kéz és ujjak, myositis, a nyelőcső motilitási zavara, változatos megjelenésű bőrtünetek. A vesék érintettsége ritkább, mint szisztémás lupus erythematosusban, 5–10%-ban észlelhető, és szövetileg a kedvezőbb kórlefolyású membranós glomerulonephritis formájában jelentkezik. A kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumában egy sajátos, a sejtmag ribonukleoproteinje (RNP) ellen termelődő autoantitest mutatható ki.

A kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegeknél is megtalálhatók az atherosclerosis korai kialakulására hajlamosító rizikófaktorok. A betegek szérumában tartósan magas a proinflammatoricus citokinek szintje (15–17). Sajátos jellemző a proliferatív vasculáris arteriopathia. Szövettanilag a kisartériák, arteriolák intimamegvastagodása, plexiform laesio, arteritis és mediahypertrophia jellemzi az elváltozást. Az endothelsejtek aktiváltak, adhéziós proteinek megjelenése tovább fokozza a szöveti gyulladást (18).

MCTD-ben a lipoproteineltérésekről eddig csak egyedi közlések ismertek, nagy betegcsoporton végzett felmérések még nincsenek (19, 20).

Munkánk alapvető célja volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan alakul a lipidprofil a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban. Milyen a természetes antioxidáns rendszer legfőbb reprezentánsának, a paraoxonáznak a szintje és aktivitása e betegek szérumban? Néztük a paraoxonázaktivitás változását a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegeken észlelt vascularis események során, és mértük a betegek szérumban az endothelsejt-aktivációs markerek, a szérumtrombomodulin és a von Willebrand-faktor-antigén-szintet.

Betegek és módszerek

A III. Számú Belgyógyászati Klinika autoimmun szakrendelésén 2003. november 1. és 2004. március 30-ig megjelent 37, kevert kötőszöveti betegség miatt kezelt és gondozott beteget (36 nőt és 1 férfit) választottunk be a vizsgálatokba. A kevert kötőszöveti betegséget *Alarcon-Segovia* és *Villareal* kritériumtünetei alapján diagnosztizáltuk (21). A 37 beválasztott beteg megfelelt a kórkép kritériumainak.

A dohányzás csökkenti a paraoxonázszintet és -aktivitást, ezért a vizsgálatból kizártuk a dohányzó betegeket; a vizsgálatot megelőző két hónapban lipid-szintet csökkentő szereket a betegek nem kaptak. Az eredményeket 30 egészséges, nemben és korban illesztett kontrollcsoport értékeivel (27 nő, három férfi) hasonlítottuk össze.

A felmérést megelőzően a 37 beteg közül 13 nem szteroid gyulladáscsökkentő szert szedett, nyolc beteg kortikoszteroid-Salazopirin kombinációs kezelésben, 11 beteg kortikoszteroid-methotrexat terápiában, öt beteg kortikoszteroidkezelésben részesült. A kortikoszteroid átlagos adagja 8,2 mg/nap volt.

A betegeket négyhavonta ellenőriztük az autoimmun járóbeteg-szakrendelésen. Évente végeztünk mellkasröntgenvizsgálatot, légzésfunkciós tesztet, Dopplerechokardiográfiát és nagy felbontóképességű CT- (HRCT-) vizsgálatot. A vizitek alkalmával a fizikális státusz rögzítése mellett meghatároztuk a vörösvértest-süllyedést, a rutin vérképet, a vese-máj funkciót, a CRP-szintet.

A lipidszintek mérése

A szérumlipid-paraméterek mérése a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben történt. A lipoprotein (a)-t, trigliceridet és HDL-C-t immun turbidimetriával (Integra 700 készülékkel) határoztuk meg. A szérumlipoprotein-elektroforézis agarózgélen, a mérés Cliniscan denzitométeren történt. Hypercholesterinaemia állt fenn 5,2 mmol/l feletti, peroxidázreakción alapuló fotometriás eljárással meghatározott szérumkoleszterin-szint esetén. Az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) számítása a Friedewald-formula

alapján, míg az apolipoprotein A1- és B-koncentrációk meghatározása immunnefelometriás módszerrel, Orion Diagnostica kit alkalmazásával történt.

A paraoxonázaktivitás mérése

A szérumparaoxonáz-aktivitás mérésekor szubsztrátként paraoxont (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát; Sigma Chemical Co.) használtunk, amely a szérumban lévő paraoxonáz enzim hatására 4-nitrofenollá alakul át, abszorpciónövekedést okozva 412 nm-en. Méréskor 50 µl szérumhoz 1 ml Tris/HCl puffert (100 mM, pH 8,0) adtunk, amely 2 mmol CaCl₂-t és 5,5 mmol/l paraoxont tartalmazott. A 4-nitrofenol keletkezését 412 nm-en 25 °C-on követtük, Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens (17 100 M⁻¹cm⁻¹) segítségével történt (22).

A paraoxonázfenotípus-megoszlás meghatározása

A paraoxonáz-fenotípust kettős szubsztrátmódszerrel határoztuk meg, a szubsztrát paraoxon és fenil-acetát volt. Paraoxonszubsztrát használatkor 1 M koncentrációban nátrium-kloridot (NaCl) is adtunk az úgynevezett NaCl-stimulált aktivitás méréséhez. NaCl jelenlétében az enzim aktív helyének konformációs állapota megváltozik – a paraoxon könnyebb kötődését és gyorsabb átalakítását eredményezve –, ezáltal nagyobb paraoxonáz-aktivitás detektálható. Fenil-acetát-szubsztráttal az enzim arilészterázaktivitását mértük. Ezen méréskor a szérumhoz 20 mM Tris/HCl pufferben (pH 8,0) 1 mM fenil-acetát oldatot használtunk; az abszorpció növekedését 270 nm-en követtük. A NaCl-stimulált paraoxonázaktivitás és az arilészterázaktivitás hányadosa jelöli ki a három, különböző aktivitással jellemezhető fenotípust: AA (kis aktivitású homozigóta), AB (közepes aktivitású heterozigóta), BB (nagy aktivitású homozigóta).

Immunszerológiai vizsgálatok

Az autoantitesteket (anti-U1RNP, anti-ENA, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo1, anti-Scl70, anti-DNS, anti-cardiolipin), antitesteket ELISA-módszerrel vizsgáltuk (Cogent Diagnostics, Edinburgh, UK és Pharmacia & Upjohn, Diagnostic GmbH, Freiburg, Németország).

A von Willebrand-faktor-antigén-szintet thrombocytaszegény plazmából immunoturbidimetriás módszerrel határoztuk meg (STA-Liatest vWF kit) Stago and STA Compact analizátoron.

A szérumtrombomodulin-szintet enzimimmunoesszével mértük (Diagnostica Stago, Asnieres, Franciaország). Az ELISA-lemez monoklonális antitrombomodulin-antitesttel fedett vályulataiba a standard minták, kontrollok mellett a betegek és egészséges dono-

1. TÁBLÁZAT

A vizsgálatba bevont, kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek demográfiai adatai és klinikai tünetei

Sajátosságok	MCTD-s betegek (n=37)	Kontroll (n=30)
<i>Alapadatok</i>		
Nő/férfi	36/1	27/3
Életkor a felméréskor ($\pm$ SD, évek)	51,2 $\pm$ 9,5	46,57 $\pm$ 9,9
MCTD fennállása ($\pm$ SD, évek)	11,0 $\pm$ 3,22	
BMI (tkg/m ²)	25,27 $\pm$ 3,22	23,62 $\pm$ 2,92
<i>Klinikai jellemzők</i>		
Polyarthrit	32 (86%)	
Raynaud-jelenség	29 (78%)	
Nyelőcső-motilitási zavar	20 (54%)	
Myositis	21 (56%)	
Légzőszervi eltérések (pulmonalis artériás hypertensio, interstitialis tüdőbetegség)	19 (51%)	
Bőrtünet (fotoszenzitivitás, cerebrovascularis eltérés)	11 (30%)	
Cardiovascularis érintettség (infarktus, angina, ischaemiás szívbetegség)	21 (56%)	
Retinakeringési zavar	9 (24%)	
BMI: testtömegindex; MCTD: kevert kötőszöveti betegség		

rok ötszörösre hígított citrátos plazmáját tettük. A lemezt két órán át szobahőmérsékleten tartottuk, majd ötször mostuk 200 μ l mosópufferrel. Ezt követően hozzáadtunk 200 μ l immunkonjugátumot és újabb két órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ismételt mosást követően 200 μ l OPD/urea-peroxid szubsztátot mérünk a lemez vályulataiba. A reakciót 50 μ l 3M kénsav hozzáadásával állítottuk le, az abszorbancia mérése Multiscan MS ELISA readeren, 492 nm-en történt. A standard mintákra mért abszorbancia és a megfelelő koncentráció ismeretében kalibrációs görbét készítettünk, amelyről ng/ml-ben olvastuk le a trombomodulinkoncentrációt.

Az endothelsejt elleni antitesteket humán köldökzsinórvéna-endothelsejten vizsgáltuk ELISA-módszerrel, korábban leírt módszerünk alapján (18).

Szemészeti eltérést akkor véleményeztünk, amikor a látászavart retinaeltérés vagy opticus atrophia okozta.

Cerebrovascularis betegséget kóriméztünk, ha az ideggyógyász által észlelt neurológiai eltéréseket CT-vel vagy MRI-vel is igazoltuk.

Coronariabetegséget diagnosztizáltunk akkor, ha 1. a betegnek heveny myocardialis infarctusa volt, vagy lezajlott myocardialis infarctus jelei látszóttak a fél-évente készített EKG-n; 2. a coronariák betegségét sebészeti módon, coronariabypassal vagy angioplastikával oldották meg; 3. az anginát angiográfiával is bizonyítottuk, és/vagy az ischaemiás elváltozásokat noninvasív teszttel, szöveti dopplerrel igazoltuk.

Statisztika

A mérési eredmények statisztikai analízise az SPSS 11.0 szoftver segítségével történt. A kiértékeléshez

Student-féle kétmintás t-próbát és nem paraméteres Mann-Whitney-tesztet, korrelációs analízist és a χ^2 -próbát használtunk. Az értékeket átlag $\pm$ szórás formában adtuk meg. Az eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A vizsgált betegek demográfiai adatait és klinikai jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza. Életkoruk a felméréskor átlagosan 51,2 $\pm$ 9,5 év, a követési idő átlagosan 11,0 $\pm$ 7,2 év volt, a testtömegindexben nem mutatkozott szignifikáns eltérés a betegek és a kontrollcsoport értékei között (BMI: MCTD: 25,27 $\pm$ 3,22 tkg/m² és kontroll: 23,62 $\pm$ 2,92 tkg/m², nem szignifikáns).

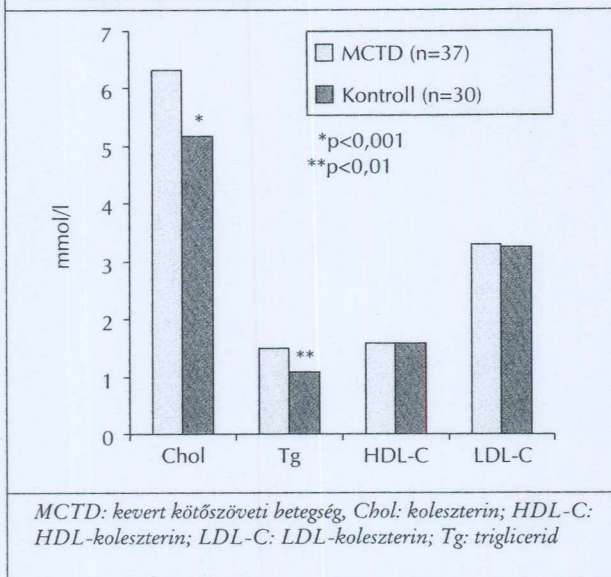
A kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumösszcholeszterin- és trigliceridszintje szignifikánsan magasabb volt, mint a korban azonos kontrollcsoporté (összcholeszterin-szint: MCTD: 6,3 $\pm$ 1,4 mmol/l, kontroll: 5,17 $\pm$ 0,8 mmol/l; $p < 0,001$, trigliceridszint: MCTD: 1,5 $\pm$ 0,8 mmol/l, kontroll: 1,08 $\pm$ 0,48 mmol/l; $p < 0,01$) (1. ábra). A HDL- és az LDL-koleszterinszintben nem volt eltérés az MCTD-s betegek és a kontrollcsoport értékei között.

Az ApoA1 mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt kevert kötőszöveti betegségben, mint a kontrollban, míg az ApoB apoprotein mennyiségében nem volt különbség az MCTD-s betegek és a kontrollcsoport között (ApoA1: MCTD: 1,6 $\pm$ 0,35 g/l, kontroll: 1,87 $\pm$ 0,28 g/l; $p < 0,01$, ApoB: MCTD: 0,97 $\pm$ 0,36 g/l, kontroll: 0,98 $\pm$ 0,7 g/l; nem szignifikáns) (2. ábra).

A betegek szérumban csökkent a paraoxonáz mennyisége a kontrollcsoport értékeihez képest, és a betegek arilészterázaktivitása is jelentősen kisebb volt

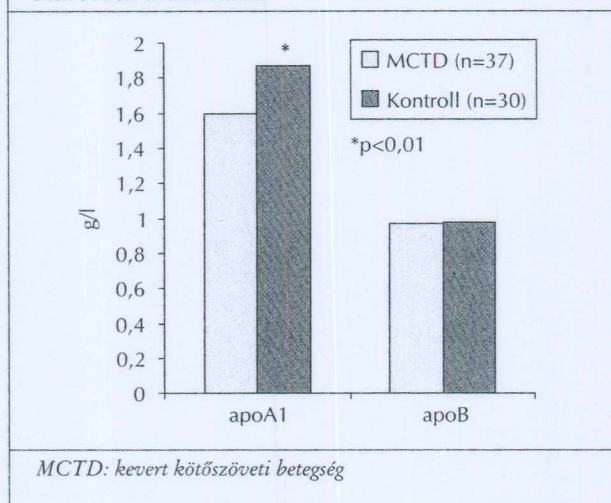
1. ÁBRA

Lipoproteinszintek a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban



2. ÁBRA

ApoA1- és apoB-szint a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban

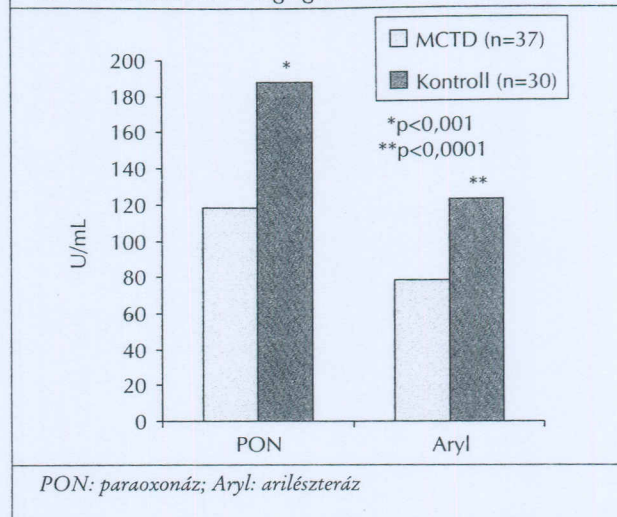


(paraaxonáz: MCTD: $118,5 \pm 64,6$ U/ml, kontroll: $188,0 \pm 77,6$ U/ml; $p < 0,001$; arilészterázaktivitás: MCTD: $78,9 \pm 15,2$ U/ml, kontroll: $123,7 \pm 29$ U/ml; $p < 0,0001$) (3. ábra).

A kevert kötőszöveti betegségben szenvedőkön a paraaxonáz fenotípusa nem különbözött az egészséges kontrollpopuláció fenotípusától (2. táblázat). A betegekben az AA fenotípus: 56,8% (kontroll: 60%), AB: 35,1%, (kontroll: 33,3%), BB: 8,1%, (kontroll: 6,7%). Az AA fenotípusba tartozó betegek paraaxonázaktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a BB homoizgota, illetve az AB heteroizgota fenotípusú MCTD-s betegekben (paraaxonázaktivitás: AA:

3. ÁBRA

A paraaxonáz- és az arilészterázaktivitás alakulása a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban



$77,3 \pm 24,7$ U/ml, AB: $147,6 \pm 50,9$ U/ml, BB: $256,8 \pm 30,7$ U/ml).

Vizsgáltuk az összefüggést a paraaxonázaktivitás csökkenése és a kevert kötőszöveti betegség, illetve az egyes vascularis eltérések között.

A paraaxonázaktivitás csökkenése összefüggött a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők életkorával ($r=0,496$, $p < 0,05$) és a betegség fennállásának idejével ($r=0,522$, $p < 0,001$) (3. táblázat). Nem találtunk összefüggést a paraaxonázaktivitás mértéke és a betegek kortikoszteroid-kezelése között. A cardiovascularis, cerebrovascularis események, a retina keringési zavara és a paraaxonázaktivitás csökkenése között szignifikáns mérvű kapcsolatot találtunk.

A tartós gyulladást és a vasculatura sérülését jelzi, hogy a betegek szérumban nagyobb a CRP mennyisége, mint a kontrollcsoportban, és megnőtt az endothelsejt elleni antitestek szérumszintje, a von Willebrand-faktor-antigén és a trombomodulin koncentrációja is (4. táblázat).

A paraaxonázaktivitás csökkenése szoros korrelációt mutatott az endothelsejt elleni antitestek szérumkoncentrációjával, az emelkedett szérumtrombomodulin- és a von Willebrand-faktor-antigén-szinttel (4., 5. ábra).

Megbeszélés

A lipidperoxidáció kivédésében szerepet játszó faktorok közül egyik jelentős tényező a HDL és az ahhoz kötődő enzimek (23). A májban termelődő paraaxonáz az ApoA1-en keresztül kötődik a HDL-hez, és megakadályozza az LDL-oxidációt és a lipoperoxidok képződését (24).

Kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek nagyszámú csoportján elsőként vizsgáltuk és igazoltuk, hogy csökkent a paraaxonáz aktivitása, és a dyslipidaemia a betegek körében fokozta a vascularis eltéréseket, elősegítve az atherosclerosis kialakulását.

2. TÁBLÁZAT

Paraoxonáz-fenotípus és -aktivitás kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek körében				
Paraoxonáz-fenotípus	Kontroll (n=30)	Paraoxonázaktivitás (U/ml), kontroll (n=30)	MCTD (n=37)	Paraoxonázaktivitás (U/ml) MCTD-ben
AA	18 (60%)	151,3±41,3	21 (56,8%)	77,3±24,7 ^a
AB	10 (33,3%)	211,8±55,3	13 (35,1%)	147,6±50,9 ^b
BB	2 (6,7%)	400,0±8,4	3 (8,1%)	256,8±30,7 ^c
Szignifikancia: a-b=p<0,001, a-c=p<0,001, b-c=p<0,01				
MCTD: kevert kötőszöveti betegség				

A vizsgált betegek szérumban a teljes szérumkoleszterin- és a trigliceridszint magasabb volt, mint az egészséges kontrollcsoportban. A teljes koleszterin- és trigliceridszint-emelkedés önmagában is hajlamosító faktor az atherosclerosis kialakulására. A lipoproteinfrakción belül a kevert kötőszöveti betegségben szenvedőkön a HDL-C koncentrációja nem csökkent, ugyanakkor alacsony volt a paraoxonáz koncentrációja és aktivitása, és csökkent az ApoA1 mennyisége is.

A paraoxonáz a májban termelődő észterhidroláz; az apoA1-hez kötődik, és védi az LDL-t az oxidatív módosulástól úgy, hogy hidrolizálja a lipidperoxidokat. Paragh és munkatársai csökkent paraoxonázaktivitást észleltek krónikus vesebetegségben, vesetranszplantációt követően (25). Tsuzura és munkatársai azt találták, hogy a szérumparaoxonáz-aktivitás diabetes mellitusban csökken, a diabeteses vascularis komplikációkban a csökkenés mértéke még kifejezettebb volt (26).

Szisztémás autoimmun kórképek közül szisztémás lupus erythematosusban több munkacsoport, Kiss és munkatársai, Dinu és munkatársai, Abe és munkatársai alacsony paraoxonázaktivitást észleltek (27–29). Tanimoto és munkatársai rheumatoid arthritises betegekben a csökkent paraoxonázaktivitás mellett alacsony ApoA1-szintet is mértek, hasonlóan ahhoz, amit mi is találtunk a vizsgált kevert kötőszöveti betegségben szenvedőkön (30).

3. TÁBLÁZAT

A paraoxonázaktivitás és az MCTD kórállapot közötti összefüggés		
Jellemzők	Összefüggés a paraoxonázaktivitással	Szignifikancia p<
Életkor a vizsgálatkor	r=0,496	0,05*
A betegség fennállása	r=0,522	0,001*
Kortikoszteroid-kezelés	RR: 0,2749	n. s. #
Cardiovascularis esemény	RR: 7,5	0,001#
Központi idegrendszeri eltérés	RR: 18,9	0,001#
Retinakeringési zavar	RR: 12,3	0,01#
n. s.: nem szignifikáns; *: korreláció; #: χ^2 -teszt; MCTD: kevert kötőszöveti betegség, RR (relative risk): relatív kockázat		

4. TÁBLÁZAT

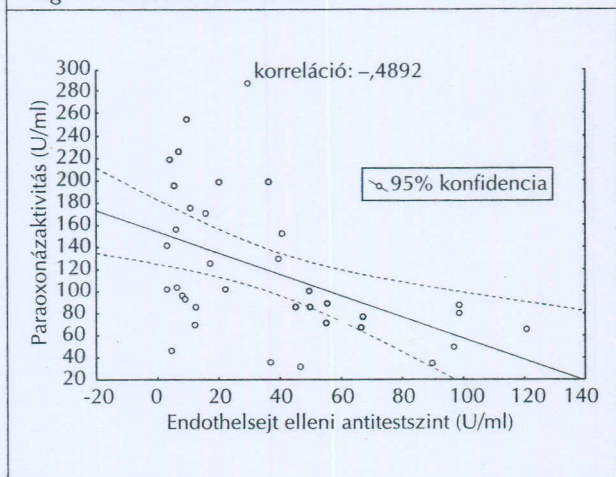
A CRP és a vascularis endothelsejt-aktivációt jelző faktorok – endothelsejt elleni antitest, von Willebrand-faktor-antigén- és trombomodulinszint – az MCTD-s betegek szérumban			
Laboratóriumi leletek	MCTD (n=37)	Kontroll (n=30)	Szignifikancia p<
CRP (mg/l)	17,3±14,3	1,8±0,97	0,01
Endothelsejt elleni antitest (U/ml)	36,8±32,8	17,7±10,2	0,001
Trombomodulin (ng/ml)	12,27±11,7	3,2±2,6	0,001
von Willebrand-faktor-antigén (%)	172,6±68	107,4±31	0,001
CRP: C-reaktív protein, MCTD: kevert kötőszöveti betegség			

Pontosan nem tudunk egyértelmű magyarázatot adni arra, hogy miért csökkent e kórképben a paraoxonáz aktivitása. A betegek szérumban levő gyulladásos mediátorok befolyásolhatják és módosíthatják a paraoxonázaktivitást. Nem lehet kizárni annak lehetőségét sem, hogy a paraoxonázaktivitás mérséklődését a máj paraoxonáztermelésének csökkenése okozza.

Az ApoA1 stabilizálja a paraoxonázt a HDL-hez, és az interferencia az ApoA1-gyel vagy a HDL-molekulával csökkentheti a paraoxonázaktivitást (31). Több

4. ÁBRA

A paraoxonázaktivitás és az endothelsejt elleni antitest szint közötti összefüggés a kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban



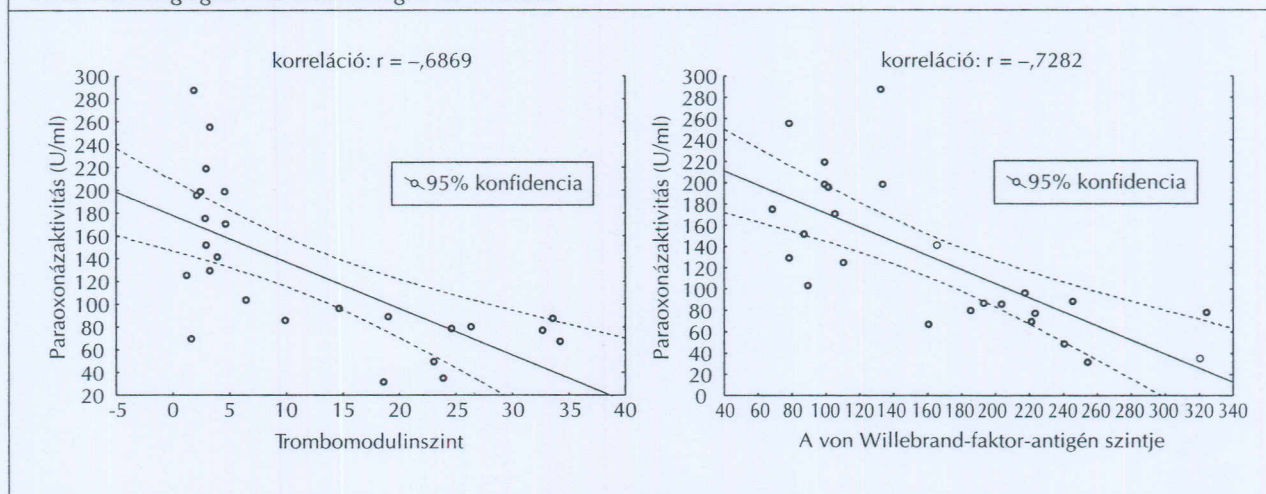
tegek szérumban található endothelsejt elleni antitestek aktiválják az endothelt, és az aktivált endothelen át monocyták és granulocyták jutnak át a szövetekbe (33, 34). Betegeinken a csökkent paraoxonázszint és -aktivitás szorosan korrelált a betegek életkorával és a kevert kötőszöveti betegség fennállásának idejével. Kevert kötőszöveti betegségben a paraoxonázaktivitás csökkenése erős összefüggést mutatott az endothelsejtaktivációs-markerek, a von Willebrand-faktor-antigén és a trombomodulinszint emelkedésével, ami a vasculatura károsodásának jelzője (35, 36).

A betegeken szignifikáns összefüggést találtunk a csökkent paraoxonázaktivitás, a cardiovascularis események, a myocardialis infarctus, angina, ischaemiás szívbetegség és a CT- vagy MR-vizsgálattal igazolt vascularis demyelinisatiós eltérések között.

A genetikai polimorfizmus is befolyásolja a paraoxonáz koncentrációját (37–39). A homozigóta BB személyeknek magasabb a paraoxonázkoncentrációjuk, mint a homozigóta AA személyeknek, míg a hete-

5. ÁBRA

A paraoxonázaktivitás összefüggése a trombomodulinszinttel és a von Willebrand-faktor-antigén szintjével kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek szérumban



munkacsoport az ApoA1 ellen termelődött antitestet talált szisztémás lupus erythematosusos betegek szérumban, de nem tudták kizárni a keresztreaktivitást az antikardiolipinnel (28, 29). Jelen vizsgálatunkban a csökkent ApoA1-szint is hozzájárulhatott a paraoxonázaktivitás csökkenéséhez.

A kevert kötőszöveti betegségben szenvedők szérumban alacsony arilészterázaktivitása arra utal, hogy az ApoA1 kevésbé tudja stabilizálni a paraoxonázt a HDL-hez.

A paraoxonáz antioxidáns enzim, nemcsak a májban van jelen, de megtalálható az artériafal endothelsejtjeiben és a simaizomsejtjeiben is. A paraoxonáz jelenléte az artériafalban rendkívül ideális hely ahhoz, hogy védje az LDL-koleszterint az oxidációtól (32).

Kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegekben a gyulladás döntően az érfalban játszódik le. A be-

rozigóta AB egyéneknek a két érték között mozog a koncentráció.

Az általunk vizsgált betegek 56,7%-a homozigóta AA fenotípusú volt, és ezeknek az egyéneknek eleve alacsonyabb a paraoxonázaktivitása. Azonban a kontrollcsoport fenotípusa is azonos volt az MCTD-s betegekével, és kevert kötőszöveti betegségben a paraoxonázszint és -aktivitás is lényegesen alacsonyabb volt, mint az egészséges kontrollban. Így a betegek igen alacsony paraoxonázaktivitása önmagában nem magyarázható a genetikai tényezőkkel.

Ismert, hogy a kortikoszteroid-kezelés csökkenti a paraoxonázszintet és -aktivitást, így felmerülhet a kezelésnek a teljes koleszterinszintre és a paraoxonázaktivitásra kifejtett hatása. Általában a 10 mg/nap vagy ennél kisebb kortikoszteroid-adag nem befolyásolja jelentősen a szérumkoleszterin-szintet (40, 41).

A vizsgálati csoportban lévő betegek átlagosan 8,2 mg/nap kortikoszteroid-kezelést kaptak, és nem találtunk különbséget a kortikoszteroiddal kezelt és a kortikoszteroidot nem szedő betegek értékei között.

Kevert kötőszöveti betegségben a paraoxonázaktivitás-csökkenés nemcsak a lipidperoxidációt rontotta, de fokozta az endothelsejt-aktivációt, a thrombogen hajlamot, ami cardiovascularis eseményt és szöveti gyuladást provokálva tovább rontotta a betegek állapotát.

Eredményeink arra utalnak, hogy kevert kötőszöveti betegségben fokozott az atherosclerosis-hajlam. Az atherosclerosis kialakulásában a koleszterinszint és trigliceridszint emelkedésén kívül szerepet játszhat a HDL-hez kötött antioxidáns, a paraoxonáz csökkent aktivitása és mennyisége. Ezért a betegeken észlelhető fokozott oxidatív folyamatok eredményeként képződő szabad gyökök eliminálása csökkent, amely súlyosbíthatja és fenntarthatja az endothelsejt-károsodást.

IRODALOM

- Alves JD, Ames PRJ, Donohue S, Stanyer L, Noorouz-Zadeh J, Ravirajan C, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and β 2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:2686-94.
- Borba EF, Bonfa E. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1997;6:533-9.
- Goodson NJ, Wiles NJ, Lunt M, Barret EM, Silman AJ, Symmons DP. Mortality in early inflammatory polyarthritis: cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:2010-9.
- Orem A, Deger O, Cimsit G, et al. Plasma lipoprotein (a) and its relationship with disease activity in patients with Behcet's disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:473-8.
- Ward MM, Pyun N, Studenski S. Causes of death in systemic lupus erythematosus: long-term followup of an inception cohort. *Arthritis Rheum* 1995;38:1492-9.
- Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:338-46.
- Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity Review* 2005.
- Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. *Autoimmunity Review* 2002;1:348-53.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmac* 1998;31:329-36.
- Chait A, Han CYH, Oram JF, Heinecke JW. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res* 2005;46:389-403.
- Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972;52:148-59.
- Hoffman RW, Greidinger EL. Mixed connective tissue disease. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:386-90.
- Aringer M, Steiner G, Smolen JS. Does mixed connective tissue disease exist? Yes. *Rheum Dis Clin N Am* 2005;31:411-20.
- Sullivan WD, Hurst DJ, Harmon CE, Esther JH. A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. *Medicine* 1984;63:92-107.
- Hassan BA, Ronnelid J, Gunnarsson I, Karlsson G, Berg L, Lundberg I. Increased serum level of immunoglobulins, C-reactive protein, type 1 and type 2 cytokines in patients with mixed connective tissue disease. *J Autoimmun* 1998;5:503-8.
- Hassan BA, Gunnarsson I, Karlsson G, Klareskog L, Forslid J, Lundberg IE. Longitudinal study of interleukin-10, tumor necrosis factor- α , anti-U1-snRNP antibody levels and disease activity in patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 2001;5:282-9.
- Bodolay E, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Végh J, Szodoray P, Soltész P, et al. Serum cytokine levels, type 1 and intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 2002;29:2136-42.
- Bodolay E, Csipő I, Gál I, Sipka S, Gyimesi E, Szekanez Z, et al. Anti-endothelial cell antibodies in mixed connective tissue disease: frequency and association with clinical symptoms. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:409-15.
- Jang JJ, Olin JW, Fuster V. A teenager with mixed connective tissue disease presenting with an acute coronary syndrome. *Vasc Med* 2004;9:31-4.
- Kanazawa M, Wada Y, Ohno T, In H, Yahata K, Izumi J, et al. Mixed connective tissue disease associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies against proteinase-3 and systemic atherosclerosis: a case report. *Clin Rheumatol* 2004;23:456-9.
- Alarcon-Segovia DA, Villareal M. Classification and diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. In: Kasukawa R, Sharp GC (eds.). *Mixed connective tissue disease and anti-nuclear antibodies*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1987. p. 33-40.
- Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyes L, Boda J, et al. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613-8.
- Paragh G, Harangi M. A HDL szerepe a cardiovascularis események megelőzésében. *Orv Hetil* 2001;142:121-6.
- Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:261-7.
- Paragh G, Seres I, Balogh Z, Varga Z, Karpati I, Matyus J, et al. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidaemia. *Nephron* 1998;80:166-70.
- Tsuzura S, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Osaki F, Arai K, et al. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004;53:297-302.
- Kiss E, Seres I, Zsolt K, Tarr T, Csipo I, Szegedi G, et al. Paraoxonáz aktivitás és lipidprofil analízise lupusos betegekben. *Orv Hetil* 2005;146:2395-402.
- Dinu AR, Merrill JT, Shen C, Antonov IV, Myones BL, Lahita RG. Frequency of antibodies to the cholesterol transport protein apolipoprotein A1 in patients with SLE. *Lupus* 1998;7:355-60.
- Abe H, Tsuboi N, Suzuki S, Sakuraba H, Takanashi H, Tahara K, et al. Anti-apolipoprotein A-I autoantibody characterisation of monoclonal autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:990-5.
- Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Ohkubo S, Ikeda Y, Hishiya K, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Science* 2003;72:2877-85.
- Mackness MI, Durrington PN. High density lipoprotein, its enzymes and their potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-53.
- Mackness B, Hunt R, Durrington PN, Mackness MI. Increased immunolocalisation of paraoxonase, clusterin and apolipoprotein A1 in the human artery wall with progress of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1233-8.
- Sasaki N, Kurose A, Inoue H, Sawai T. A possible role of anti-endothelial cell antibody in the sera of MCTD patients on pulmonary vascular damage relating to pulmonary hypertension. *Ryumachi* 2002;42:885-94.
- Nishimaki T, Aotsuka S, Kondo H. Immunological analysis of pulmonary hypertension in connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1999;26:2357-62.
- Salomaa V, Matei C, Aleksic N, et al. Soluble trombosmodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: A case-cohort study. *Lancet* 1999;353:1729-375.
- Wu KK. Soluble trombosmodulin and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:373-5.
- Róna K, Szabó I, Gachályi B, Czinner A, Káldor A. A humán szérumbal paraoxonáz polimorfizmus. *Orv Hetil* 1987;128:2469-72.
- Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphism, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003;81:766-79.
- Abbot CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;11:1812-8.
- Doria A, Sarzi-Puttini P, Shoenfeld Y. 2nd Conference on heart, rheumatism and autoimmunity, Pescara, Italy, May 19-20, 2005. *Autoimmunity Review* 2005;5:55-63.
- Lahita RG, Rivkin E, Cavanagh I, Romano P. Low levels of total cholesterol, high-density lipoprotein A1 in association with anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1566-74.