

PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií

Kukačka J., Zikmundová K., Kotaška K., Halačová M., Vajtr D., Průša R.

Ústav klinické biochemie a patobiochemie Univerzity Karlovy 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol

SOUHRN

Cíl: Matrixové metaloproteinázy (MMP) a metaloproteináza PAPP-A se podílejí na progresi a rozpadu aterosklerotických plátů. Cílem této práce bylo zjistit vliv dietního opatření po 3 měsících léčby a farmakoterapie statiny po 3 měsících léčby na koncentraci matrixových metaloproteináz MMP-3 a MMP-9 a metaloproteinázy PAPP-A u skupiny 40 pacientů se smíšenou DLP a kontrolního souboru (n = 40). Dalším cílem bylo stanovit referenční hodnoty MMP-3 a MMP-9 u zdravých osob.

Materiál a metody: Byly stanoveny hladiny základních parametrů lipidového metabolismu (celkový cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triacylglyceroly) na přístroji ADVIA 1650 soupravami Bayer. MMP a PAPP-A byly stanoveny imunochemickými metodami.

Výsledky: V případě dietního režimu se hladiny lipidů významně nezměnily. U pacientů léčených hypolipidemiky byl 3 měsíce po zahájení léčby zaznamenán pokles všech parametrů vyjma HDL-cholesterolu. U souboru zdravých osob byla naměřena koncentrace 16,33 ± 1,72 µg/l pro MMP-9 a 7,52 ± 0,71 µg/l pro MMP-3. Koncentrace MMP-3 činila před dietním zásahem 8,31 ± 1,36, po dietě 5,40 ± 0,99 µg/l, pokles nebyl statisticky významný (p < 0,05). Ani farmakoterapií nedošlo ke statisticky významné změně MMP-3 (8,31 ± 1,36 versus 5,40 ± 0,99 µg/l; p < 0,05). Podávání hypolipidemik vedlo k poklesu koncentrace MMP-9 z 38,32 ± 4,50 µg/l před terapií na 27,36 ± 2,58 µg/l po terapii. Jak dietní opatření, tak farmakoterapie způsobily významný pokles PAPP-A, v případě diety z 9,44 ± 0,47 mU/l na 7,97 ± 0,41 mU/l, farmakoterapií z 7,99 ± 0,48 mU/l na 5,71 ± 0,38 mU/l (p < 0,05).

Závěr: Na hladiny cirkulujících metaloproteináz měla vliv farmakoterapie i dietní opatření. Zvláště patrné je to u PAPP-A. Matrixové metaloproteinázy a PAPP-A by se mohly uplatnit v monitorování průběhu hypolipidemické terapie, kde sledování základních parametrů lipidového metabolismu není vždy postačující.

Klíčová slova: dyslipoproteinémie, ateroskleróza, matrixové metaloproteinázy, PAPP-A, statiny.

SUMMARY

Kukačka J., Zikmundová K., Kotaška K., Halačová M., Vajtr D., Průša R.: PAPP-A and matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with mixed dyslipoproteinemia

Objective: Matrix metalloproteinases and metalloproteinase PAPP-A participate in process of atherosclerotic plaque degradation. Serum levels of circulating metalloproteinases are altered in subjects with atherosclerosis. This study aimed to examine the effect of diet and pharmacotherapy by statins on MMPs and PAPP-A levels after 3 months of therapy.

Material and Methods: We examined 40 patients with mixed form of dyslipoproteinemia and 40 normolipidemic healthy controls. Moreover, reference values for MMP-3 and MMP-9 in healthy subjects were determined. We measured serum parameters of lipid metabolism (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides) using ADVIA 1650 analyzer with the reagents Bayer. MMPs and PAPP-A were measured using immunochemical methods.

Results: We noted no changes in lipid parameters after diet therapy. On the other hand, all lipid parameter concentrations except HDL-cholesterol were affected by pharmacotherapy. We determined serum levels for MMP-9 (16.33 ± 1.72 µg/l) and MMP-3 (7.52 ± 0.71 µg/l) in healthy subjects. Mean values for MMP-3 were 8.31 ± 1.36 µg/l before diet and 5.40 ± 0.99 µg/l after diet; 8.31 ± 1.36 µg/l before and 5.40 ± 0.99 µg/l after pharmacotherapy. Hypolipidemics caused a decrease in MMP-9 concentrations (38.32 ± 4.50 µg/l vs. 27.36 ± 2.58 µg/l; p < 0.05). Both diet and pharmacotherapy lead to decrease of PAPP-A serum values: 9.44 ± 0.47 mU/l vs. 7.97 ± 0.41 mU/l by diet, 7.99 ± 0.48 mU/l vs. 5.71 ± 0.38 mU/l by pharmacotherapy (p < 0.05).

Conclusion: Circulating levels of metalloproteinases, especially of PAPP-A, are altered by both pharmacotherapy and diet. MMPs and PAPP-A might be considered as independent predictors of developed atherosclerosis. Furthermore, in monitoring of lipids-lowering therapy these enzymes may be applied.

Key words: dyslipoproteinemia, atherosclerosis, matrix metalloproteinases, PAPP-A, statins.

Úvod

Vznik a rozvoj aterosklerózy je ovlivněn interakcí mnoha rozličných faktorů, které kromě poruch metabolismu lipidů zahrnují změny v expresi růstových faktorů, cytokinů a vazoregulačních faktorů, regulujících funkce buněk cév v souvislosti se změnami v intimě cévy, extracelulární matrix krevními buňkami a složkami krevní plazmy. Zvláštní význam tu má extracelulární matrix.

Důležitou roli pak sehrává při vzniku aterosklerotických plátů, jejich progresi a následném rozpadu [1]. Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou enzymy, které zajišťují fyziologickou remodelaci extracelulární matrix. MMP jsou rodinou 23 strukturálně příbuzných enzymů patřících do početné skupiny zinek dependentních endopeptidáz. MMP se účastní řady fyziologických procesů, při kterých dochází k degradaci pojivové tkáně, ale i procesů zánětlivých, degenerativních a maligních spo-

jených se zvýšenou syntézou, degradací nebo porušenou maturací a organizací extracelulární matrix [2–4]. Experimentálně byla potvrzena klíčová úloha MMP v procesu aterogeneze. Uvnitř aterosklerotických plátů byla stanovena zvýšená aktivita několika MMP (MMP-1, MMP-3 a MMP-13) v porovnání s hodnotami MMP u normální arteriální stěny. Zároveň se při těchto procesech mění jejich koncentrace v krevním řečišti [5]. Stanovení hladin MMP bylo dříve prováděno pouze v souvislosti s náhlými cévními mozkovými příhodami, infarktem myokardu, u osob s rizikovými faktory aterosklerózy, mezi něž patří i poruchy lipidového metabolismu. V této souvislosti je významný i efekt některých hypolipidemik na aktivitu MMP. Některá hypolipidemika, např. statiny, inhibují aktivitu MMP [6]. Pregnancy-Associated Plasma Protein (PAPP-A) je vysokomolekulární protein patřící do skupiny matrixových metaloproteináz, identifikovaný v plazmě těhotných žen. PAPP-A je ceněn i jako ukazatel kardiovaskulárního rizika. Byla prokázána jeho zvýšená koncentrace v erodovaných a prasklých aterosklerotických plátech, zatímco jeho koncentrace ve stabilních plátech je minimální. Tato předběžná zjištění nasvědčují tomu, že vzrůst koncentrace PAPP-A by mohl odrážet časná stadia vzniku aterosklerotických lézí, dokonce při absenci klinických příznaků aterosklerózy [7].

Cílem této práce bylo stanovit koncentrace metaloproteináz MMP-3, MMP-9 a PAPP-A u dyslipidemických pacientů a zjistit vliv dietního opatření a farmakoterapie statiny.

Metody a soubor pacientů

Základní soubor byl tvořen 40 osobami s prokázanou poruchou lipidového spektra (tab. 1). Všichni pacienti byli starší 18 let. 20 prvních pacientů dodržovalo režimová a dietní opatření bez hypolipidemické farmakoterapie po dobu 3 měsíců, 20 pacientů, u kterých selhala dietní léčba, užívalo statiny (Simvacard Zentiva, ČR; 20 mg simvastatinu/den), fibráty (Lipirex S-Winthrop, Francie 160 mg fenofibrátu/den) nebo kombinace obou těchto léků po dobu 3 měsíců. Do studie nebyli zařaze-

Table 1. Parameters of lipid metabolism in healthy controls and subjects with dyslipoproteinemia

	DLP patients before therapy	Controls
n	40	40
Age	51.5 ± 19	43 ± 15
Sex (n, male/female)	20/20	20/20
Cholesterol (mmol/l)	6.39 ± 0.23*	4.66 ± 0.79
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.37 ± 0.59	1.42 ± 0.58
LDL-cholesterol (mmol/l)	4.05 ± 0.21*	2.76 ± 0.08
Triglycerides (mmol/l)	2.68 ± 0.38*	1.26 ± 0.07

(mean ± SEM; *denotes significant difference $p < 0.05$)

ní pacienti s cévními onemocněními, s historií akutního koronárního syndromu, diabetem, nádorovými onemocněními nebo jinými závažnými poruchami. Kontrolní soubor tvořilo 40 jedinců (20 mužů a 20 žen) bez abnormalit v lipidovém spektru. Léčeným pacientům byla odebrána krev před léčbou a po 3 měsících léčby, kontrolní skupině pouze jednou. Studie splňuje principy Helsinské úmluvy.

Laboratorní vyšetření

Parametry lipidového metabolismu byly stanoveny do 4 hodin po odběru, pro ostatní analýzy bylo získané sérum zamrazeno a skladováno při -70 °C. Koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a triacylglycerolů byly stanoveny na automatickém biochemickém analyzátoru Advia 1650 (Bayer; Německo) diagnostickými sety Bayer. Analýza koncentrace MMP-3 a MMP-9 byla provedena imunochemicky, pomocí diagnostických kitů Biotrak Activity Assay System (Amersham Biosciences; USA). Koncentrace PAPP-A byla měřena na imunochemickém analyzátoru Kryptor (BRAHMS; Německo) diagnostickým kitem BRAHMS.

Analýza dat

Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 4.0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Normální rozložení dat u jednotlivých souborů bylo ověřeno Kolmogorovovým-Smirnovovým testem. V případě normálního rozložení dat byly pro další analýzu použity parametrické testy (Studentův t-test). Pro neparametrická rozložení bylo použito neparametrického t-testu (Mannův-Whitneyův U-test). Všechna prezentovaná data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SEM. U neparametrického rozložení dat byla provedena logaritmická transformace dat.

Výsledky

U skupiny pacientů léčených dietním režimem se hladiny lipidů statisticky významně nezměnily: průměrná hodnota koncentrace celkového cholesterolu před léčbou byla 5,61 mmol/l a po léčbě 5,48 mmol/l; koncentrace HDL-cholesterolu se také výrazně nezměnila. Ani v případě LDL-cholesterolu i triacylglycerolů nebyla změna signifikantní (tab. 2).

U pacientů léčených hypolipidemiky byl 3 měsíce po zahájení léčby zaznamenán signifikantní pokles celkového cholesterolu z průměrných hodnot 7,17 mmol/l na 6,14 mmol/l, LDL-cholesterolu z 4,60 mmol/l na 3,81 mmol/l. Průměrná koncentrace HDL-cholesterolu se nezměnila. Pokles koncentrace triacylglycerolů z 3,12 mmol/l na 2,13 mmol/l byl také významný (viz tab. 2).

Koncentrace MMP-3 byla nižší u kontrolního souboru než u souboru pacientů s dyslipoproteinémií (DLP). Statisticky významný byl rozdíl sérových koncentrací MMP-9 mezi zdravými jedinci a pacienty s DLP (tab. 3). Průměrná koncentrace PAPP-A u souboru pacientů s DLP byla 8,72 ± 0,48 mU/l před léčbou, pro zdravé osoby uvádí výrobce hodnoty PAPP-A ≤ 4 mU/l.

Table 2. Characteristics of DLP patients before and after 3 months treatment by diet and pharmacotherapy

	n	Total cholesterol (mmol/l)	HDL-cholesterol (mmol/l)	LDL-cholesterol (mmol/l)	Triglycerides (mmol/l)
DLP patients before diet	20	5.61 ± 0.26	1.36 ± 0.08	3.49 ± 0.23	2.24 ± 0.53
DLP patients after 3 months diet	20	5.48 ± 0.24	1.33 ± 0.07	3.43 ± 0.21	1.72 ± 1.20
DLP patients before pharmacotherapy	20	7.17 ± 0.28	1.38 ± 0.09	4.60 ± 0.32	3.12 ± 0.55
DLP patients after 3 months pharmacotherapy	20	6.14 ± 0.21*	1.38 ± 0.08	3.81 ± 0.18*	2.13 ± 0.26*

(mean ± SEM; *denotes significant difference $p < 0.05$)

Table 3. MMP-3 and MMP-9 concentrations in group of patients with DLP and control healthy subjects

	n	MMP-3 (µg/l)	MMP-9 (µg/l)
Patients with DLP	40	8.90 ± 1.81	36.66 ± 2.67
Healthy controls	40	7.52 ± 0.71	16.33 ± 1.72*

(mean ± SEM; *denotes significant difference $p < 0.05$)

Koncentrace MMP-3 činila před dietním zásahem $8,31 \pm 1,36$, po dietě $5,40 \pm 0,99$ µg/l, pokles nebyl statisticky významný (graf 1). Ani farmakoterapii nedošlo k významné změně ($9,5 \pm 3,40$ vs $6,76 \pm 1,32$ µg/l). Pokles koncentrace MMP-9 byl statisticky významný, z $38,32 \pm 4,50$ µg/l před terapií na $27,36 \pm 2,58$ µg/l po terapii hypolipidemiky; vliv dietního režimu nebyl statisticky potvrzen, koncentrace před dietou činila $38,18 \pm 2,84$ mg/l, po dietě $31,69 \pm 1,90$ µg/l. Jak dietní opatření, tak farmakoterapie způsobily významný pokles PAPP-A, v případě diety z $9,44 \pm 0,47$ mU/l na $7,97 \pm 0,41$ mU/l, farmakoterapií z $7,99 \pm 0,48$ mU/l na $5,71 \pm 0,38$ mU/l.

Diskuse

Náš soubor dyslipidemických pacientů měl koncentraci cholesterolu o 36 % vyšší než soubor kontrolních zdravých jedinců. Dietním tříměsíčním zásahem došlo k poklesu o 2,4 %, ale farmakoterapií o 17 %. K farmakoterapii byli indikováni pacienti, jejichž průměrná koncentrace celkového cholesterolu v séru byla $7,17 \pm 0,28$ mmol/l. Přídavný účinek hypolipidemické léčby spočívá pravděpodobně v odstranění akumulace makrofágů v aterosklerotických lézích s následnou inhibicí aktivity matrixových metaloproteináz. K monitorování tohoto procesu by bylo vhodné stanovení sérových MMP v průběhu terapie. Současná klinická praxe však zatím používá sledování jiných parametrů lipidového metabolismu.

V této práci jsme stanovili hladiny cirkulujících matrixových metaloproteináz MMP-3 a MMP-9 v séru zdravých osob. Referenční meze MMP v séru zdravých osob nejsou dostatečně známy, a proto naše práce v této oblasti může k této problematice přispět. Znalost referenčních mezí MMP je zásadní pro aplikaci do rutinní klinicko-biochemické diagnostiky. Koncentrace MMP-3 stanovená v našem souboru 40 zdravých osob

byla $7,52 \pm 0,71$ µg/l. Hodnota je mírně nižší, než se uvádí v jiných pracích, které stanovovaly cirkulující hladinu u souboru zahrnující menší počet pacientů, jinou než střeoevropskou populaci nebo byl použit jiný diagnostický kit [8–10]. Ještě problematictější je stanovení referenčních mezí u MMP-9. V dostupné literatuře se různé průměrné hodnoty kontrolních souborů pohybovaly od 5,8 do 69 µg/l. Převažují však hodnoty kolem 20 µg/l, a to potvrzuje i námi naměřená hodnota u 40 zdravých jedinců, která činila $16,33 \pm 1,72$ µg/l.

Zvýšené koncentrace cirkulující MMP-9 v séru až o několik desítek procent jsou známy především u různých nádorových onemocnění, kde zároveň dochází ke zvýšené expresi jejich přirozených inhibitorů, a tedy i k vyšší koncentraci cirkulujících komplexů MMP/TIMP, což je nutno zohlednit při volbě laboratorní metody pro jejich stanovení [11]. Vyšší hladiny cirkulující MMP-9 nacházíme i u pacientů s DLP, což se potvrdilo i v této

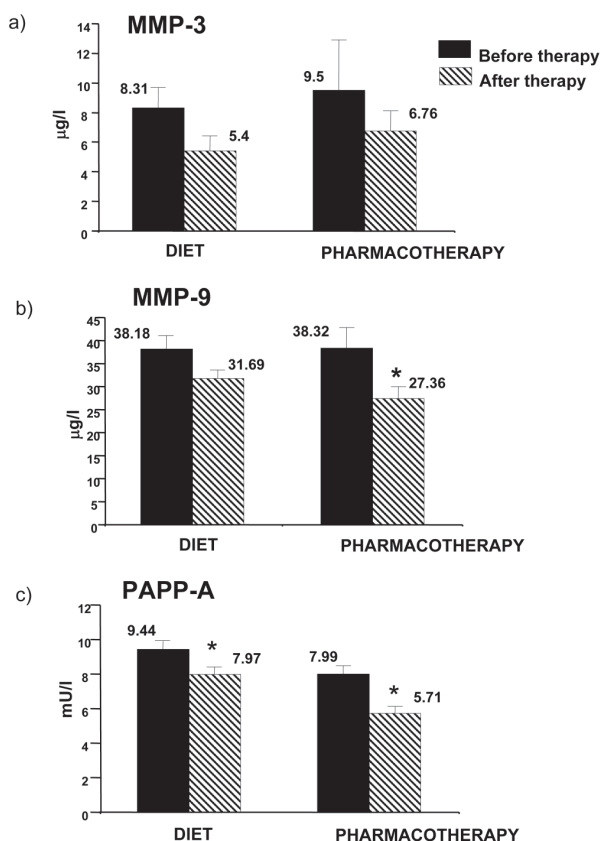


Fig. 1. Serum levels of MMP-3 (a), MMP-9 (b), and PAPP-A (c) in DLP patients before and after 3 months treatment by diet and pharmacotherapy (mean ± SEM; *denotes significant difference $p < 0.05$)

práci, kde koncentrace MMP-9 u pacientů s DLP byla o 125 % vyšší než u kontrolního souboru. Jak poukazují některé studie, MMP-9 je nezávislý prognostický rizikový faktor u pacientů s ICHS [12, 13]. Prokázali jsme pokles koncentrace MMP-9 po třech měsících dietního opatření o 17 %, v případě tříměsíční farmakoterapie o 28,6 %. Koncentrace MMP-3 po 3 měsících klesla, v případě dietního režimu až o 35 %, pokles však nebyl statisticky významný. MMP-3 je také považována za marker nestability aterosklerotických plátů. Byla publikována práce, kde byla sledována aktivita MMP-3 po terapii hypolipidemiky a např. u pacientů s izolovanou hypercholesterolemií léčených 10 týdnů atorvastatinem 20 mg/den klesla MMP-3 o 58 % [8].

PAPP-A by mohl být vhodným markerem subklinické aterosklerózy, protože podle některých studií se jeho prediktivní funkce neliší od ostatních používaných analytů [14]. Existuje mnoho důkazů, že PAPP-A je schopný detekovat rupturu plátu mnohem dříve než osvědčené markery používané pro diagnostiku infarktu myokardu, srdeční nekrózy nebo koronárního syndromu [15]. Pro zdravou populaci uvádí výrobce hodnoty PAPP-A menší než 4 mU/l, aktuální referenční meze určené citlivější metodou (ultrasenzitivní PAPP-A) jsou stanoveny na 0,4–1,04 mU/l [16]. Pacienti s DLP měli zvýšenou hladinu PAPP-A. Cílem bylo, stejně jako u matrixových metaloproteináz, zjistit vliv farmakoterapie a dietního opatření na koncentraci PAPP-A u pacientů s DLP. V obou případech došlo k významnému poklesu, v případě diety o 15,6 %, farmakoterapií o 28,5 %. Je velmi pravděpodobné, že vliv statinů na inhibici této metaloproteinázy bude velmi podobný jako je tomu u MMP-9.

Závěr

Matrixové metaloproteinázy MMP-3 a MMP-9, stejně jako metaloproteináza PAPP-A, se ukazují jako vhodné časné markery ICHS. Z této práce vyplývá, že všechny tři metaloproteinázy by se mohly také uplatnit v monitorování úspěšnosti hypolipidemické terapie. Na hladiny cirkulujících metaloproteináz měla vliv jak farmakoterapie, tak dietní opatření. Zároveň jsme stanovili referenční rozmezí u zdravých osob pro MMP-3 a MMP-9.

Literatura

1. **Katsuda, S., Kaji, T.** Atherosclerosis and extracellular matrix. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2003, 10, p. 267–274.
2. **Kukacka, J., Prusa, R., Kotaska, K., Pelouch, V.** Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2005, 149, p. 225–236.
3. **Arthur, M. J.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000, 279, p. G245–249.
4. **Stetler-Stevenson, W. G., Yu, A. E.** Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin. Cancer Biol.*, 2001, 11, p. 143–152.
5. **Loftus, I. M., Thompson, M. M.** The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc. Med.*, 2002, 7, p. 117–133.
6. **Beaudeux J. L., Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M. J., Chapman, M. J.** Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 42, p. 121–131.
7. **Bayes-Genis A., Schwartz, R. S., Lewis, D. A., Overgaard, M. T., Christiansen, M., Oxvig, C., Ashai, K., Holmes, D. R., Jr., Conover, C. A.** Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, 21, p. 335–341.
8. **Malik, J., Stulc, T., Ceska, R.** Matrix metalloproteinases in isolated hypercholesterolemia. *Int. Angiol.*, 2005, 24, p. 300–303.
9. **El Messal, M., Beaudeux, J. L., Drissi, A., Giral, P., Chater, R., Bruckert, E., Adlouni, A., Chapman, M. J.** Elevated serum levels of proinflammatory cytokines and biomarkers of matrix remodeling in never-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 366, p. 185–189.
10. **Koh, K. K., Ahn, J. Y., Jin, D. K., Han, S. H., Kim, H. S., Choi, I. S., Ahn, T. H., Shin, E. K., Jeong, E. M.** Comparative effects of statin and fibrate on nitric oxide bioactivity and matrix metalloproteinase in hyperlipidemia. *Int. J. Cardiol.*, 2004, 97, p. 239–244.
11. **Zucker S., Hymowitz, M., Conner, C., Zarrabi, H. M., Hurewitz, A. N., Matrisian, L., Boyd, D., Nicolson, G., Montana, S.** Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1999, 878, p. 212–227.
12. **Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Poirier, O., Bickel, C., Smieja, M., Hafner, G., Meyer, J., Cambien, F., Tiret, L.** Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 2003, 107, p. 1579–1585.
13. **Kalela, A., Koivu, T. A., Sisto, T., Kanervisto, J., Hoyhtya, M., Sillanauke, P., Lehtimäki, T., Nikkari, S. T.** Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2002, 62, p. 337–342.
14. **Biasucci, L. M., Rizzello, V.** Pregnancy-associated plasma protein-A: do specific markers of vascular or plaque activation exist, and do we really need them? *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 913–914.
15. **Futterman, L. G., Lemberg, L.** Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. *Am. J. Crit. Care*, 2002, 11, p. 168–172.
16. **Mueller, T., Dieplinger, B., Poelz, W., Haltmayer, M.** Increased pregnancy-associated plasma protein-A as a marker for peripheral atherosclerosis: results from the Linz Peripheral Arterial Disease Study. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1096–1103.

Do redakce došlo 4. 1. 2007.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Jiří Kukačka

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

V Úvalu 84

150 06 Praha 5-Motol

e-mail: jiri.kuckacka@lf2.cuni.cz