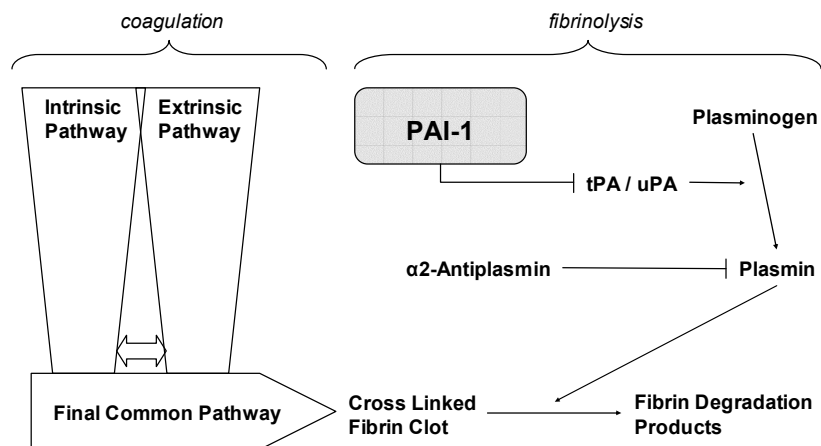


PAI-1 som mulig markør ved detektion af Atherosclerosis, hos patienter med Diabetes Mellitus.



Indledning

Baggrund

Atherosclerose
Metabolt Syndrom
Brug for nye markører

Hovedafsnit

PAI-1 i sit sammenhæng
Nagi et al.
Scelles et al.
Diskussion
Konklusion

Sammenfatning

Litteraturliste

Indledning

Vi skal i vores opgave kigge på nye mulige plasmamarkører for kardiovaskulær sygdom hos diabetespatienter, og har derfor valgt at undersøge korrelationen mellem fibrinolyshæmmeren Plasminogen Activator Inhibitor-1 og hjerte-karsygdom. Vi har sammen med grundviden og oversigtsartikler indenfor emnet udvalgt to originalarbejder der vi behandler, for at prøve at komme nærmere en forklaring af hvorvidt Plasminogen Activator Inhibitor-1 kan bruges som risiko-markør for udvikling af Atherosclerosis hos patienter med Diabetes Mellitus.

Baggrund

Atherosclerose

Hjerte-karsygdom, også kaldet åreforkalkning, atherosklerose og arteriosklerose er den hyppigste årsag til dødsfald i Danmark. Den indebærer en fortykkelse af pulsåreernes vægge, ofte i coronarkar, i hjernens kar og i benene. Fortykkelsen består af kalkaflejringer, fedt og kolesterol, der er indlejret i bindevæv og glatte muskelceller. Fortsætter fortykkelsen, vil der efterhånden være så smal en passage for blodet, at der kan rives hul på karvæggen, og så kan der dannes en thrombe/embolisme. Denne kan brydes af og okcludere et blodkar nedstrøms. Hjerte-karsygdom indebærer også en forhøjet risiko for udposninger, så kaldte aneurismer, især i aorta.

Atherogenesens første steg er udviklingen af så kaldte fatty streaks, små subendotielle lipidindlejringer. Herefter kan low density lipoprotein (LDL) invadere endotelet og blive oxideret. Denne initiale skade af blodkaret udløser en inflammatorisk respons, hvilket rekrutterer monocytter fra blodet der differentierer til makrofager. Disse endocyterer oxideret LDL i tunica intima og da begynder deres langsomme forandring til foam celler, hvilke har fået sit navn på grund af sin store koncentration af cytoplasmiske vesikler med høj lipidkoncentration. Efter hånd dør foam cellerne og dette bidrager endnu mere til inflammationsprocessen. Der er også en fra T-cellerne medieret cytokin-signalering til de glatte musklerne, der prolifererer og migrerer fra tunica media og inkapsulerer fatty streak, hvilket gennem tiden omdannes til en fibrøs cap mellem fedtindlejringen og intimaen. Disse så kaldte atheromas kan aktivere enzymer der får arterien at vokse til over tiden, og så længe dette kan kompensere for atheromans ekstra tykkelse opstår ikke nogen forsnævring af lumen, stenose. Det er når denne kompensatoriske mekanisme ikke er tilstrækkelig som man kan se ruptur og thrombosis, og det er ofte først da som patogenesen bliver symptomatisk [1, 2].

Metabolt syndrom

Metabolic syndrome er en term der bruges for at benævne et antal faktorer der forøger risikoen at rammes af hjerte-karsygdomme. De forskellige faktorer i det metabole syndromet er hver for sig en risiko for at blive syg, og sammen virker de synergistisk. En konsekvens af

dette er at hos en person med metabolt syndrom er risikoen for hjerte-karsygdom kraftigt forøget. En af definitionerne på metabolt syndrom er den fra World Health Organization (WHO) i 1999 [3], der kræver tilstedeværelse af diabetes mellitus, nedsat glukose tolerans, nedsat glukose ved faste eller insulinresistans og en af følgende: højt blodtryk ($\geq 140/90$ mmHg), dyslipidemi (triglycerider (TG) $\geq 1,695$ mmol/L), central obesity (body mass index (BMI) $> 30\text{kg/m}^2$), microalbuminuria (urinær albuminexkretion ratio $\geq 20\text{mg/min}$ eller albumin/creatinin ratio ≥ 30 mg/g) [1, 3].

Brug for nye markører

De biokemiske markører der traditionelt bruges til at diagnosticere atherosclerose; P-glucose, glycosylered hæmoglobin (HbA1c), lipider er ikke brugbare hos patienter med Diabetes Mellitus. Diabetespatienters atherogenese skyldes ikke forhøjet kolesterol eller forhøjet blodtryk, hvorfor monitorering af deres sygdomsforløb vanskeliggøres. Det findes en høj forekomst af kardiovaskulære sygdomme hos patienter med Diabetes Mellitus og en samtidig relativt ukendt patogenese af disse sygdomme hos denne patientgruppe, hvorfor det ligger i sundhedsvæsenets interesse at finde nye blodprøvemarkører for at tidligt identificere, diagnosticere og forebygge [1, 4].

Hovedafsnit

PAI-1 i sit sammenhæng

Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) er en så kaldt Serpin (*serin protease inhibitor*) af hvilke de fleste, ifølge navnet, inhiberer proteaser (enzymmer der nedbryder proteiner). Genen for PAI-1 findes på kromosom syv og udgøres af ni exoner og otte introner på cirka 12000 baser. Kendskabet til dets promotor er uddybet og flere af de vigtigste regulatoriske element er identificeret.

PAI-1 er uden besvær at konstatere i plasma. I den ældre befolkning findes højere koncentration af PAI-1, og 50-60 ng mL⁻¹ er ikke usædvanligt blandt middelalders mænd. Dog kan koncentrationerne variere kraftigt. Det findes en velforstået circadiansk variation i plasma PAI-1, og dets højeste niveau er på den tidlige morgen hvilket svarer til det samtidige laveste punkt af fibrinolytisk aktivitet.

PAI-1 secernerer primært af vaskulært endotel i blodkar, men kan også blive produceret af for eksempel adipøs væv og leveren. Store mængder lejes i blodplader og giver plade-rige koagula der er resistente mod thrombolyse. PAI-1 virker gennem at inhibere serinproteaserne tissue plasminogen activator (tPA) og urokinase (uPA), hvilke aktiverer plasminogen der i aktiv form, benævnt plasmin, nedbryder flere plasmaproteiner der indgår i fibrin clots. PAI-1 virker sammen med α 2-Antiplasmin der inhiberer plasmin, som de vigtigste inhibitorer af fibrinolyse, lysningen af fibrin clots. Disse faktorer spiller en afgørende rolle i kroppens hæmodynamik, det vil sige balance mellem de koagulerende kaskader og fibrin nedbrydningen.

Endotelceller i fravær af hormonel, metabol eller inflammatorisk stimuli producerer sandsynligvis ikke store mængde PAI-1. En række af cytokiner der stimulerer endotel at producere PAI-1 er identificeret, blandt andet tilvækstfaktorer og tilvæksthormoner, for eksempel transforming growth factor β (TGF β), østrogen, thrombin og insulin. Vigtigt er dog at inflammatoriske cytokiner som interleukin-1 og tumor necrosis factor α (TNF α) kan inducere endotel at producere PAI-1. Disse faktorer antages også at forfremme vaskulær inflammation og Atherosclerosis.

Ved PAI-1 mangel ses en forøget tendens til at bløde da fibrinolysen ikke standses adækvat. I inflammatoriske tilstand, da fibrin indlejres i væv, virker PAI-1 at spille en rolle i progressionen til fibrosis, hvilket indebærer en patologisk forering af bindevæv. PAI-1 findes i forhøjede niveauer hos for eksempel patienter med fedme og metabolt syndrom. Dette har mentes at eventuelt korrespondere til den forøgede forekomst af thrombosis hos disse patienter [1, 5, 6].

Nagi et al.[7]

Formålene med studien var at undersøge aktivitet af PAI-1 hos kostbehandlede type 2-diabetiker og patienter med nedsat glukosetolerans samt at bestemme hvorvidt PAI-1-aktiviteten er forskellig hos asiater sammenlignet med kaukasier.

196 asiater fra et Ismaili-samfund i London udvalgte sluppmæssigt og kontaktes af forskerne. 113 viste interesse for at deltage som forsøgspersoner og derefter bortvalgte personer med tidligere hjertesygdom, kendt diabetes, graviditet eller igangværende thiaziduretika- eller p-pillerbehandling. I alt fandt man 104 personer egnet til at deltage i studien. Forsøgspersonerne var mellem 35 og 70 år.

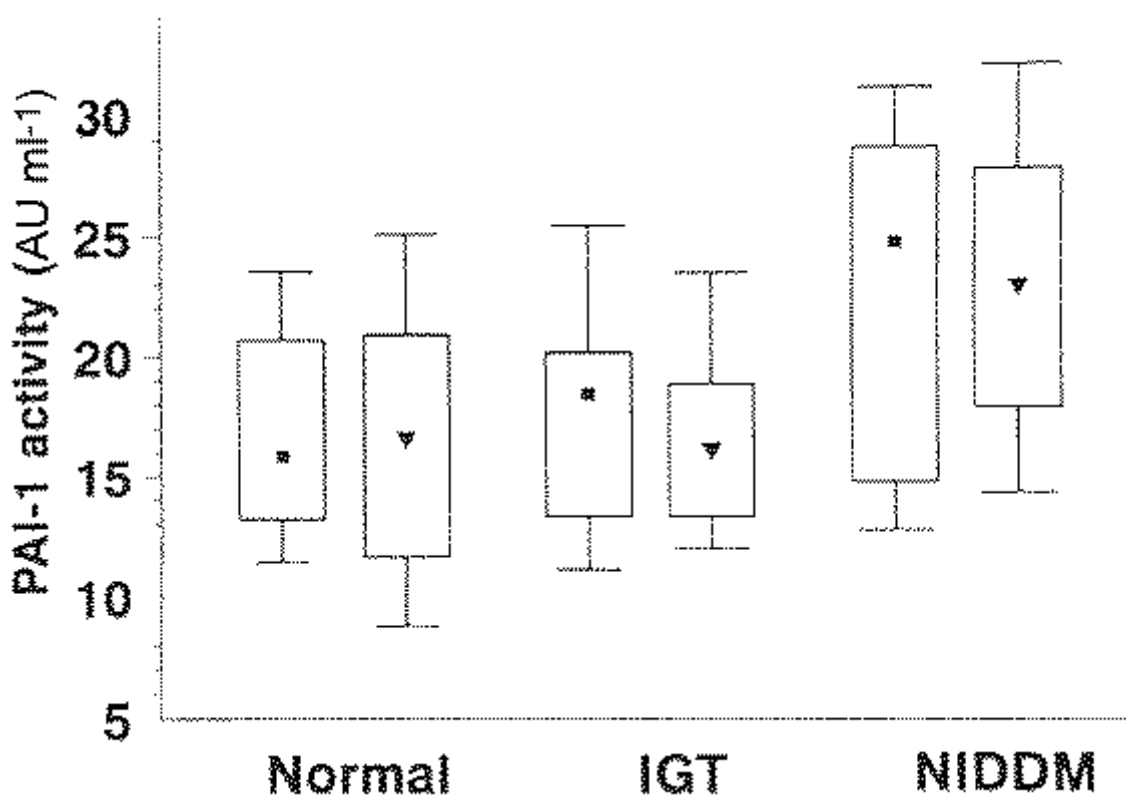
Disse forsøgspersoner matchedes med hensyn til alder og køn med kaukasier. Dette gjordes sluppmæssigt fra almenpraktikkens patientlister. Blandt disse gjordes en sortering efter oven nævnte kriterier og 91 personer udvalgte.

34 asiatiske og 47 kaukasiske diabetes type 2-patienter, diagnosticerede udefra WHO's kriterier, valgte sluppmæssigt for at deltage i forsøget. Forsøgspersonerne deltes op i forskellige kategorier efter glukosetolerans; normal glukosetolerans (NGT), nedsat glukosetolerans (IGT) og non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM).

Studien viste at diabetes var signifikant relateret til PAI-1-aktiviteten. Da man vægter BMI, weight hip ratio, insulin, intakt proinsulin, des 31, 32 proinsulin (metabolit af proinsulin) og TG med i analysen er relationen mellem diabetes og PAI-1 reduceret men stadig signifikant.

Det har i tidligere studier påvist at asiater i Storbritannien har en forøget risiko for hjerte-karsygdom samt forøget risiko for glukoseintolerans og høj forekomst af NIDDM. Dette kan skyldes hyperinsulinemi og at asiater har højere insulinresistens end kaukasier. Et formål med studien var derfor at finde hvis denne øgede risiko er afhængig af aktiviteten af PAI-1.

I studien påvist dog ingen forskel i PAI-1-aktivitet mellem asiater og kaukasier indenfor de forskellige kategorier af glukosetolerans (NGT, IGT, NIDDM). Den øgede risikoen for ischemisk hjertesygdom hos asiater kan således ikke forklares udefra aktivitet af PAI-1.



Boxplot med PAI-1-aktivitet for de tre undersøgte grupper, NGT, IGT og NIDDM [7]. Medianværdier er markerede med firkanter for asiater og trekanten for kaukasier. Bokserne beskriver fordelingen af kvartilen, den 25. til 75. percentil (hundrededel). Det betyder at de værdier der er mindre end den nedre observation (første kvartil) udgør mindst en fjerdedele af alle observationer. Den øvre del af boksen kaldes tredje kvartil og de værdier der er mindre end denne udgør tre fjerdedele. Anden kvartil er det samme som medianværdien. De nedre og øvre markeringerne på de lodrette streger fra bokserne viser henholdsvis den 10. og den 90. percentil [8].

Det man tydeligt kan udlæse fra denne graf er at PAI-1-aktiviteten er væsentligt højere hos personer med NIDDM end personer fra de andre to grupper; kvartilen ligger betydeligt højere ligesom medianværdierne. Man konstaterer også i teksten at PAI-1-aktiviteten var højere hos forsøgspersoner med NIDDM sammenlignet med personer med normal glukosetolerans og

nedsat glukosetolerans. I modsætning til tidligere studier gælder resultatet for personer med kostbehandlet NIDDM, uden tidligere hjerte-karsygdom og med svag til moderat hyperglykemi.

Man kan videre se i diagrammet at der ikke findes en stor forskel mellem PAI-1-aktiviteten hos de forskellige etniske grupper og heller ikke en betydende forskel mellem NGT- og IGT-kategorierne. Forfatterne skriver at PAI-1-niveaun ikke var forhøjet hos personer med nedsat glukosetolerans (IGT) sammenlignet med de med normal glukosetolerans. Forskellen i PAI-1-aktivitet mellem de forskellige etniske grupper var heller ikke statistisk signifikant.

Relationen mellem NIDDM og PAI-1-aktiviteten kan ikke helt forklares med overvægt, triglyceridkoncentration eller koncentrationer af insulin og proinsulin-lignende molekyler. Muligvis har kronisk hyperglykemi, typisk ved NIDDM, også en stimulerende effekt på aktiviteten af PAI-1. Ved in vitro dyrkning af endotelceller i høj koncentration af glukose har man påvist forøget PAI-1-aktivitet, hvilket styrker denne hypotese.

At der findes en relation mellem triglyceridkoncentration og PAI-1-aktivitet tyder på at insulinresistens påvirker PAI-1-aktiviteten. At triglyceridkoncentrationen er forhøjet ved insulinresistens, særligt NIDDM, er tidligere bevist. Det skulle derfor kunne være sådan at insulinresistens direkte eller indirekte (via forhøjet TG-koncentration), undertrykker fibrinolysen og dermed giver en øget risiko for udvikling af hjerte-karsygdom. Aktiviteten af PAI-1 kan udgøre den komponent der forklarer associationen mellem forhøjet triglyceridkoncentration og hjerte- og karsygdomme hos personer med NIDDM. In vitro forsøg har vist at VLDL påvirker endotelceller at udskille PAI-1 og at den stimulerende effekt øges ved høj TG-koncentration. En forhøjet triglyceridkoncentration skulle derfor også kunne være en vigtig regulator af PAI-1-aktiviteten in vivo.

Proinsulin-lignende molekyler viser i studien en tydelig relation til aktiviteten af PAI-1. Proinsulin-lignende molekyler har i andre studier vist sig at være mere kapable end insulin som markør for insulinresistens. Dette indikerer at relationen mellem proinsulin-lignende molekyler og PAI-1-aktivitet kan være en indikator for relationen mellem PAI-1-aktivitet og insulinresistens.

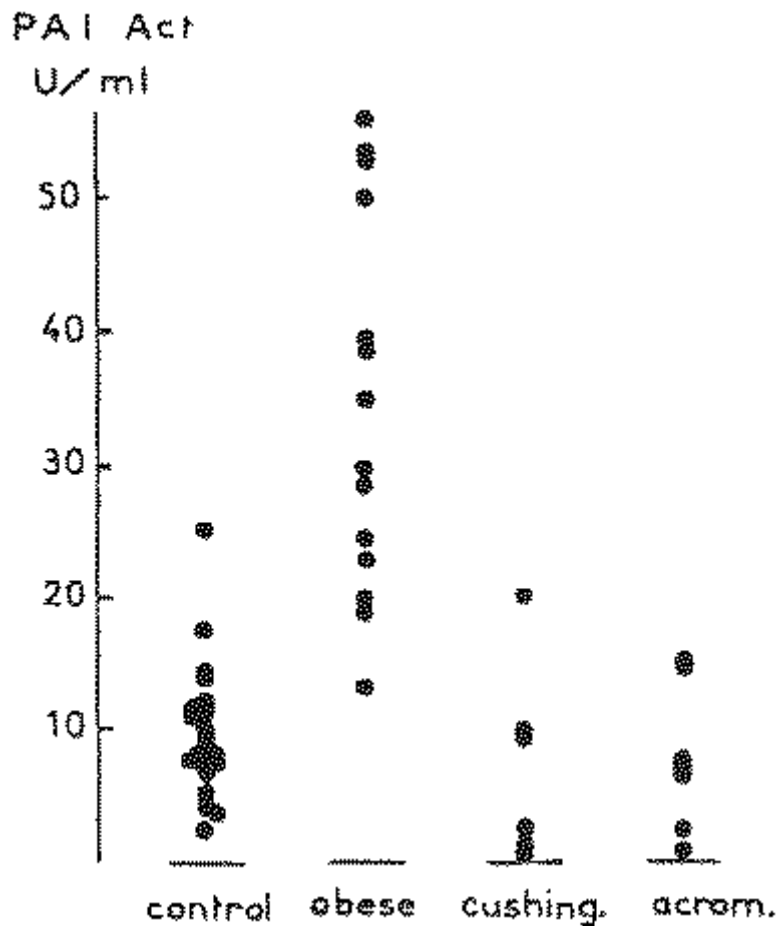
Sammenfattende bedømmer forskerne i studien at den øgede risiko for ischemisk hjertesygdom hos personer med NIDDM delvis kan være relateret til aktiviteten af PAI-1.

Scelles et al.[9]

Tidligere studier har vist at fedme årsager et hypofibrinolytisk tilstand som konsekvens af forhøjet PAI-1. Forøget niveau af PAI-1 synes at være en komponent af insulinresistanssyndromet, en hypotese der forstærkes af at behandling mod insulinresistans giver mindsket PAI-1- og insulinkoncentration. Imidlertid blev det påvist at *akut* forøgelse af insulinkoncentration ikke har indflydelse på PAI-1 koncentration uanset om forøgelse i insulinkoncentration var endogen eller tilført udefra. Forskernes formodning var at forøgelse af PAI-1 i plasma er afhængig af typen af insulinresistans, hvorfor forsøgets formål var at undersøge koncentration af PAI-1 ved forskellige typer af insulinresistans.

Der blev udpeget tre grupper af mennesker repræsenterende insulinresistans forårsaget af henholdsvis fedme, Cushings sygdom og akromegali. Resultaterne fra de tre grupper blev sammenlignet med den fjerde, kontrolgruppen. Den første, gruppe I, bestod af 14 patienter (fire mænd) med BMI-indeks over 28 (kvinder) og 30 (mænd). Den anden gruppe inkluderede seks patienter (en mand) som alle sammen led af hypofyseadenoma. I den tredje gruppe var der 7 patienter (fire mænd) med dokumenteret akromegali. Kontrolgruppen bestod af 20 personer (10 mænd). Ingen af forsøgspersonerne led af diabetes.

Repræsentanterne af alle tre grupper havde forhøjet plasmainsulin ved faste, sammenlignet med kontrolgruppen. Plasmaglukoseniveau var normalt, på den måde var det klart at alle personer udviser resistans over for insulin. Triglycerider samt PAI-1-niveau var forhøjede hos patienter fra gruppe I (fedme) men uden væsentlige afvigelser hos patienter med Cushings sygdom og akromegali (se indsat figur neden). Forskerne har således udelukket forhøjet niveau af kortisol og væksthormon, hvilket ses hos henholdsvis Cushings sygdom og akromegali, som positive faktorer i forøgelse af PAI-1 plasmakoncentration.



PAI-1-aktiviteten for de fire undersøgte grupper [9].

Artikelforfatterne foreslår fire forklaringer på det forhøjede niveau af PAI-1 hos patienter fra gruppe I (fedme):

1. At det skulle være en tilfældig korrelation mellem insulin- og PAI-1-niveau. Denne forklaring er dog ikke acceptabel fordi typiske faktorer som vægttab eller motion påvirker plasmakoncentration af PAI-1, ligesom plasmakoncentration af insulin.
2. Patienter i denne gruppe har også et forhøjet niveau af triglycerider i modsætning til de andre to grupper. Især VLDL stimulerer endotelcellernes syntese af PAI-1 og bidrager dermed til forhøjning af faktorens koncentration i plasma. Her skal dog bemærkes at afvigelsen i koncentrationen af triglycerider ikke er særlig stor.
3. Et forhøjet niveau af henholdsvis kortisol og væksthormon hos grupperne med Cushings sygdom og akromegali kan eventuelt have en antagonistisk effekt på PAI-1-aktiviteten og på den måde muligvis reducere en forhøjet PAI-1-niveau. Dog er denne eventuelle mekanisme ukendt.

4. Mekanismerne bag den mindskede følsomhed over for insulins er forskellige i alle tre grupper og desuden er de kun ufuldstændigt klarlagt.

Forskerne konkluderer at insulinresistans i sig selv ikke kan opfattes som årsagen til et forhøjet plasma PAI-1 hos folk der lider af fedme eller NIDDM.

Diskussion

Originalarbejderne beskriver kliniske undersøgelser der er relevante for vores arbejde da de diskuterer begreb, og præsenterer materiale, der indgår i vores problemstilling. Dog kan man måske bemærke på randomiseringen og på antallet forsøgspersoner i artiklen af Scelles et al. Antallet forsøgspersoner er meget begrænset og derfor kan tilfældigheder spille en stor rolle, de forskellige forsøgsgrupper indeholder personer af varierende alder og man skriver ikke at det kompenseres for dette. Også med tanke på køn, etnicitet og kropsdistribution af fedt findes der ingen jævn fordeling, hvorfor større undersøgelser der tager hensyn til disse faktorer bør laves. Undersøgningen beskrevet af Nagi et al. har en tydelig randomisering ved udvalg af forsøgspersoner, og Ismaili-samfundet udgør en betydelig mængde asiater med flere nationaliteter. Dog kan denne population ikke menes at kunne repræsentere hele den asiatiske befolkning da denne udgøres af et langt større folketal, der kan have relevant genetisk og anden forskel.

Nagi et al. konkluderer at risikoen for ischemisk hjertesygdom hos personer med NIDDM eventuelt kan være relateret til høj PAI-1 koncentration. PAI-1 kan således ikke med sikkerhed siges være lempelig som markør for atherosclerose hos patienter med NIDDM bare på baggrund af denne studie. Man kan derimod mene at resultaterne peger på at PAI-1 skulle kunne udgøre en mulig ny markør, men det kræves flere studier der mere nøjagtigt studerer relationen mellem PAI-1 og atherosclerose hos personer med Diabetes Mellitus.

Studien af Scelles et al. udreder ikke fremmest hvorvidt PAI-1-niveaun kan anvendes som indikator for Atherosclerosis. De kommer frem til at andre faktorer end insulinresistans med nødvendighed spiller en rolle for at opnå et forhøjet niveau af PAI-1. Scelles et al. viser også i sin studie at personer med fedme, hyperinsulinemi og insulinresistens har øgede PAI-1-niveauer. Denne gruppe har også forhøjede triglyceridkoncentration. Akromegali og Cushings-

grupperne har hyperinsulinemi, insulinresistens men ikke forøget TG og heller ikke øget PAI-1-niveau. Denne forskel i triglyceridmængde menes kunne være en afgørende faktor for de forhøjede PAI-1-nivåerne hos overvægtige, noget der også Nagi et al. har foreslået og som de i denne artikel mener kunne forklares udefra insulinresistans.

Konklusion

Vi kan således ikke konkludere at det med baggrund af disse to artikler virker muligt at kunne bruge PAI-1 som markør for atherosclerose hos patienter med insulinresistens og/eller hyperinsulinemi i sig selv. Dog kan vi konkludere at hvis det findes en forhøjet niveau af triglycerider sammen med insulinresistens findes der en eventuel øget risiko for PAI-1 overproduktion, og dermed en forhøjet risiko at rammes af hjerte-karsygdom.

Måske vil videre studier vise på en mere specifik association mellem forhøjet triglyceridniveau hos patienter med Diabetes Mellitus og forøget PAI-1-koncentration. Hvis øget PAI-1-niveau også vises være en primær årsag til (specifikke mekanismer i) Atherosclerosis hos personer med NIDDM ville dermed PAI-1 være en mere potent markør, og en tydeligere konklusion til vores spørgsmål kunne opnås. Noget der, med tanke på vore artiklers alder, med sikkerhed allerede er mere uddybet.

Sammenfatning

Vi valgte som opgave at kigge på Plasminogen Activator Inhibitor-1 som mulig markør for Atherosclerosis hos patienter med Diabetes Mellitus. Til vores hjælp brugte vi originalarbejder der beskrev to kliniske forsøg. Med baggrund af disse, og af anden viden indenfor området, kunde vi konkludere at PAI-1 eventuelt kan komme at bruges som markør for hjerte-karsygdom. Før dette bliver realitet kræves dog meget mere uddybende studier om markørens variabilitet hos forskellige grupper af mennesker, og de mere specifikke biokemiske processer den er involveret i hos personer i de nævnte patologiske tilstande.

Litteraturliste

1. Baynes, John W and Marek H Dominiczak. *Medical Biochemistry*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2nd Edition 2005
2. "atherosclerosis." Wikipedia. Wikipedia, 2007 17 Mar. 2007.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Atherosclerosis>
3. "metabolic syndrome." Wikipedia. Wikipedia, 2007. Answers.com 17 Mar. 2007. <http://www.answers.com/topic/metabolic-syndrome>
4. Melholt Rasmussen, Lars. *Diabetes – Iskæmisk Hjerter-karsygdøm – Biokemiske markører*. Syddansk Universitet, 12 Feb. 2007
5. Wilczynska, Malgorzata. *Homeostasis and fibrinolysis lecture*. Umeå University, 30 Jan. 2006.
6. Vaughan DE. *PAI-1 and atherothrombosis*. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1879-83
7. Nagi DK, Mohamed Ali V, Jain SK, Walji S, Yudkin JS. *Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) Activity is Elevated in Asian and Caucasian Subjects with Non-insulin-dependent (Type 2) Diabetes but not in Those with Impaired Glucose Tolerance (IGT) or Non-diabetic Asians*. *Diabet Med* 1996 Jan; 13: 59-64
8. "Box plot" Wikipedia. Wikipedia, 2007 16 april 2007.
http://en.wikipedia.org/wiki/Box_plot
9. Scelles V, Raccach D, Alessi MC, Vialle JM, Juhan-Vague I, Vague P. *Plasminogen Activator Inhibitor 1 and Insulin Levels in Various Insulin Resistance States*. *Diabete Metab* 1992; 18: 38-42