

SERUM PROLİDAZ I AKTİVİTESİNİN KEMİK YAPIM-YIKIM İNDEKSİ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ*

Yıldız ÖNER İYİDOĞAN*, Figen GÜRDÖL**, Pernur ÖNER**

ÖZET

İlerleyen yaşla ve menopozal dönemin başlamasıyla birlikte kemik yapımında azalma olduğu, buna bağlı olarak osteoporotik kırıkların arttığı bilinmektedir. Menopozdan sonra osteoporozun ortaya çıktığı ve kemik yapım-yıkımına ait biyokimyasal parametrelerin değişikliğe uğradığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Prolinin glisil ile yaptığı peptid bağımlı yıkan bir enzim olan prolidaz aktivitesinin kollajen yıkım hızıyla direkt olarak ilişkili olması beklenir. Bu nedenle çalışmamızda bu enzimin serumdaki aktivitesinin kemik yıkımı göstergesi olarak kabul edilip edilemeyeceğini araştırmak istedik.

Deneyisel aşamada, çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı kadınlarda ve erkeklerde serum prolidaz aktivitesi diğer kemik yapım-yıkım göstergeleriyle birlikte ölçüldü. Sağlıklı kadınlar premenopozal ve postmenopozal olmak üzere iki grupta, erişkin erkekler ise tek grupta (median yaş: 30) değerlendirildi. Osteokalsin (BGP) düzeylerinde üç grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Total alkali fosfataz (TALP), prolidaz I ve tartarat dirençli asit fosfataz (Tr-ACP) aktivitelerinde ise postmenopozal grupta premenopozal gruba göre anlamlı artış saptandı. Erişkin orta yaş gruplarında ise Prolidaz I ve Tr-ACP aktivitesinde cinsiyete bağlı bir farklılık gözlenmedi. Erişkin erkek grubunda BGP değerlerinin normal sınırlar içinde kaldığı ve TALP aktivitesinde kadın grubuna göre bir artış olduğu görüldü.

Serum prolidaz I aktivitesinin ölçümünün kolay uygulanabilir olması ve enzim aktivitesinin sağlıklı erişkinde çok büyük varyasyonlar göstermemesi, bu enzimin rutin laboratuvarında bir indeks olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle osteoporozu diğer klinik ve laboratuvar yöntemlerle kanıtlanmış olan hastalarda tedavi öncesi ve sonrası prolidaz I aktivitesi ölçümleri yapılarak bu konuda kesin bir değerlendirmeye gidilmesi uygundur.

Anahtar Kelimeler: Menopoz, osteokalsin, osteoklastik aktivite, osteoblastik aktivite, prolidaz I.

SUMMARY

Evaluation of serum prolidase I activity as an index for osteoclastic activity. The relationship between age or menopausal status and bone formation has been extensively studied, and it was revealed that postmenopausal bone loss and subsequent osteoporosis are major causes of bone fractures. In the present study, currently known biochemical indices of bone formation and resorption such as osteocalcin (BGP), alkaline phosphatase (TALP) and tartrate resistant acid phosphatase (Tr-ACP) were measured in sera of women in order to examine the early effects of menopause on bone status. Serum prolidase I activity was also studied, since this enzyme is involved in the last step of collagen degradation.

BGP levels did not show any difference between the groups studied. TALP, Prolidase I and Tr-ACP activities were found significantly elevated in postmenopausal group when compared to those of premenopausal group. On the other hand, there was no difference in the activities of both prolidase I and Tr-ACP with regard to sex. Prolidase I activity was slightly correlated with Tr-ACP activity in postmenopausal group. Although prolidase I activity seemed to be a potential index for osteoporosis, further studies are needed in osteoporotic patients before and after medical therapy. These biochemical parameters should also be evaluated together with the radiodiagnostic findings.

Key Words: Menopause, osteocalcin, osteoblastic activity, osteoclastic activity, prolidase I.

Mecmuaya Geldiği Tarih: 18.12.1998

* İstanbul Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Çapa, İstanbul.

** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

* İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuasının 62:2, 1999 sayısında yayınlanan bu yazı anlam değişikliğine yol açan bazı hatalar nedeniyle tekrar basılmıştır.

GİRİŞ

İlerleyen yaşla ve menopozal dönemin başlamasıyla birlikte kemik yapımında azalma olduğu, buna bağlı olarak osteoporotik kırıkların arttığı bilinmektedir. Menopozdan sonra osteoporozun ortaya çıktığı ve kemik yapım-yıkımına ait biyokimyasal parametrelerin değişikliğe uğradığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (23). Bu parametrelerden osteokalsin (BGP), total alkali fosfataz (TALP; EC 3.1.3.1) ve alkali fosfatazın kemik izoenzimi, prokollajen 1 karboksiterminal uzantı peptidi (PICP)'nin serumdaki ölçümleri kemik yapımının; serumda tartarat dirençli asit fosfataz (Tr-ACP; EC 3.1.3.2) aktivitesi, 24 saatlik idrarda piridinolin ve piridinolinli peptidler, deoksipiridinolin içeren peptidler, hidroksprolin (Hyp), hidrosilizin glikozidleri ve kalsiyum düzeyleri kemik yıkımının biyokimyasal göstergeleri olarak değerlendirilmiştir (9,15).

Prolidaz (EC 3.4.13.9) C terminalinde prolin (Pro) veya hidroksprolin (Hyp) bulunan dipeptidlere spesifik bir hidrolazdır. Kollajenin yapısında yüksek miktarda (%25 Pro ve Hyp) bulunduğu için bu enzim kollajen ve prokollajen yıkımında önemli rol oynar. Ancak prolidazın kemik yıkımının biyokimyasal göstergesi olarak değerlendirildiği bir çalışmaya literatürlerde rastlanmamıştır. Fibroblastlardan ekstre edilen prolidazın iki formu olduğu ve bunlardan prolidaz I diye adlandırılan formun mol ağırlığının 105000 ve prolidaz II diye adlandırılan formun mol ağırlığının 151000 olduğu bildirilmiştir (18). Bunlardan sadece prolidaz I formunun insan plazmasında bulunduğu, Mn²⁺ iyonları ile uzun süreli preinkübasyonun prolidaz II aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (20).

Daha önceki çalışmalarda serum prolidaz aktivitesinin karaciğer sirozunda ve hasarında arttığı bildirilmiştir (2). Kronik etanol ve selenyum verilen sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesi kontrollere oranla artmış bulunmuştur (21). Aynı şekilde CCl₄ uygula-

nan sıçanların karaciğerlerinde prolidaz I aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (19).

Osteokalsin osteoblastlarda sentezlenen, kemik dokusu için spesifik olan nonkollajen küçük bir proteindir (9). Bu protein, menopozda kemik yapım-yıkım hızı ile artar. Postmenopozal kadınlarda serum BGP düzeyleri normal, düşük veya yüksek bulunmuştur (3,4). Menopoz sonrası ortalama serum BGP artışı, kırık riskinin arttığını gösterir. Osteokalsin düzeyleri sirkadyen bir ritim göstererek sabahtan öğleye kadar azalır. Gece yarısından sonra ise artar (6). Aynı şekilde serum BGP düzeyleri menstruel siklus sırasında değişir (24). Luteal fazda en yüksek değerlere rastlanmıştır. TALP enzimi kemik yapımın biyokimyasal ölçütlerinden biridir. Hücre membranlarının ekstraselüler yüzeyindeki glikozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına bağlanan bir glikoproteindir. Enzim membrana bağlıyken tetramer, dolaşımda iken dimerdir. TALP'in çeşitli izoformları vardır ve aktivitesinin yaşlanma ile özellikle postmenopozal kadınlarda arttığı gösterilmiştir (9).

TR-ACP osteoklastlarda önemli miktarda bulunan ve kemik yıkımı sırasında açığa çıkan lizozomal bir enzimdir. TR-ACP'in kemikten izole edilmiş izoenzimi tip 5 asit fosfatazıdır. Bu izoenzim kemik yıkım göstergesi olarak kabul edilmiştir ve aktivitesinin metabolik kemik hastalıkları olan kişilerde arttığı bilinmektedir (16,24).

Çalışmamızın amacı, kemik yapım-yıkım parametreleri olarak kabul edilen BGP, TALP, TR-ACP'nin menopoza ve cinsiyete bağlı olan değişimlerini incelemek ve prolidaz I' in serumdaki aktivitesinin kemik yıkımı göstergesi olarak kabul edilemeyeceğini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma grupları: Bu çalışmada; sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan 11 premeno-

pozal (Yaş 25-39, median 29), 16 postmenopozal (Yaş 38*59, median 49) kadın ve 9 erkek (Yaş 25-41, median 30) araştırma gruplarını oluşturdu.

Biyokimyasal ölçümler: Her üç gruptan da sabah 9-10 saatleri arasında (premenopozal grupta menstruel siklusun 5,-8.günlerinde olacak şekilde) açlık kan örnekleri alınarak serum ayrıldı ve ölçümler yapılmaya kadar -700 C' de donduruldu.

Prolidaz I: Serum prolidaz I aktivitesi glisin L-prolin' in substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle çalışıldı (7). Maksimum enzim aktivasyonunu sağlamak için, serum 1:5 oranında Tris-HCl-MnCl₂ tamponuyla seyreltilip 370C'de 24 saat preinkube edildi. Enzim aktivitesi IU/Lolarak ifade edildi.

Osteokalsin: Sağlam insan osteokalsinine karşı gelişen antikor kullanarak yapılan yarışmalı Radioimmunoassay (RIA) ile OSCA test osteokalsin (İnsan BGP'e karşı toplanmış tüp sistemi) B.R.A.H.A.M.S Diagnostica Berlin GMBH kiti ile çalışıldı. Osteokalsin konsantrasyonu ng/mL olarak ifade edildi.

TALP: Total alkali fosfataz aktivitesi Tech-

nicon Otoanalizör 24 ile çalışıldı. Enzim aktivitesi IU/L olarak ifade edildi.

Tr-ACP: -700C'de dondurulan serum 1:4 (1mL serum+4 mL bidistile su) ile sulandırılarak Lau yöntemine göre çalışıldı (16). Değerlendirme p-nitro fenol standart eğrisine göre yapıldı. Enzim aktivitesi IU/L olarak ifade edildi.

Biyoistatistik: İstatistiksel analizler Student's t-test ve Spearman-Rank sıra bağıntı yöntemi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Üç deney grubunun biyokimyasal parametreleri ve bunların karşılaştırılması Tablo 1' de görülmektedir.

1. Osteokalsin düzeylerinde üç grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Erkek grubundaki 6.2±1.3 ng/mL ile premenopozal gruptaki 5.0±1.5 ng/mL ve postmenopozal gruptaki 6.2±3.8 ng/mL değerleri arasında stabil bir dağılım gözlemlendi.

2. Total alkali fosfataz aktivitelerinde erkeklerden ve postmenopozal kadınlardan elde edilen ortalama değerlerin premenopozal gruba göre (p<0.01) anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü.

Tablo 1. Sağlıklı kişilerde osteokalsin (BGP) değerlerinin, TALP, Tr-ACP ve Prolidaz I aktivitelerinin karşılaştırılması

	ERKEK	KADIN	
	n=9 (Yaş median:30)	Premenopozal n=11 (Yaş median:29)	Postmenopozal n=16 (Yaş median:49)
Yaş (yıl)	32.28±8.54	51.52±7.33	< 0.001*
Osteokalsin (ng/mL)	6.2±1.3	5.0±1.5	6.2±3.8
TALP (IU/L)	75.3±18.1**	54.3±13.9	77.4±17.3**
Tr-ACP (IU/L)	18.0±4.1**	13.8±1.6*	22.2±5.4***
Prolidaz I (IU/L)	1061±237	933±208	1231±208

* p<0.001 Postmenopozal grup ile karşılaştırma

** p<0.01 Premenopozal grup ile karşılaştırma

*** p<0.05 Erkek grubu ile karşılaştırma

3. Tartarat dirençli asit fosfataz aktivitelerinde erkeklerden oluşan grupta premenopozal gruba göre $p<0.01$ düzeyinde; postmenopozal grupta erkek grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde, premenopozal gruba göre ise $p<0.001$ düzeyinde ileri derecede anlamlı fark saptandı.

4. Prolidaz I aktivitesinde postmenopozal grupta premenopozal gruba göre $p<0.001$ düzeyinde ileri derecede anlamlı fark bulundu. Ancak aynı yaş grubundaki farklı cinsler arasında bir fark gözlenmedi.

Korelasyon analizleri: Prolidaz I aktivitesinin serumda ölçülen diğer parametrelerle bağıntısı araştırıldığında premenopozal kadınlarda ve erkek grubunda herhangi anlamlı korelasyon görülmedi. Postmenopozal grupta ise Tr-ACP ile prolidaz I arasında $r=0.4$ oranında anlamlı olmamakla birlikte pozitif bir bağıntı görüldü ($r=0.39$; $n=16$).

TARTIŞMA

Dolaşımdaki osteokalsinin kısa bir yarılanma süresi olduğu ve kolayca böbrekten atılabildiği gösterilmiştir (17). Serum BGP konsantrasyonları gelişme döneminde kemik büyümesine bağlı olarak artar. Bununla birlikte kemik yapım-yıkımının arttığı primer ve sekonder hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, Paget hastalığı ve akromegali gibi durumlarda artış gösterdiği bilinmektedir. Hipotiroidizmde, hipoparatiroidizmde, glukokortikoidli kişilerde, multipl myelomda ve ilerlemiş kanserlerde ise BGP düzeylerinin düştüğü belirlenmiştir (8). BGP düzeylerinin klinik tanıda diğer kemik parametreleriyle birlikte değerlendirilmesi geçerli ve önemli bir indeks olarak kabul edilmektedir (9). Ancak bu değerler kullanılan yöntem ve laboratuvara göre değişim gösterir; örneğin Kelley ve arkadaşları RIA yöntemiyle çalışmışlar ve serum osteokalsin referans değerlerini 3-18 $\mu\text{g/L}$ bulmuşlardır (14). Takahashi ve arkadaşlarının çalışmasında BGP referans değer-

leri premenopozal kadında 5.0 ± 0.4 ng/mL , postmenopozal kadında 8.7 ± 0.5 ng/mL olarak belirlenmiştir (23). Harris ve arkadaşlarının çalışmasında ise 6.4 ± 1.3 ng/mL bulunduğu bildirilmiştir (11). Bizim uyguladığımız RIA yönteminde 30-60 yaş arası kadın ve erkeklerde normal sınırlar, 4-12 ng/mL arasındadır ve dağılımın normal sınırlar içinde olduğu görülmektedir (3). Bu bulgulara göre BGP değişiminin yaşa ve cinsiyete bağlı olmadığı, değişim olabilmesi için yaşlanma ve cinsiyet dışında hastalık veya toksik faktörlerin oluşması gerektiği düşünülmektedir.

TALP aktivitelerinin postmenopozal dönemde menopoz öncesi değerlere göre daha yüksek olmasının önceki çalışmalarda bulunan sonuçlarla uyumlu olduğu ve bu artışın osteoblastik aktivitenin hızlanmasıyla ilişkili bulunduğu söylenebilir (9). Literatürde erişkin kadın ve erkeklerde TALP aktivitesinin alt ve üst sınırları kadınlarda 40-190 IU/L, erkeklerde 50-190 IU/L olarak verilmiştir. Buna göre erkeklerde alt sınır kadınlara göre daha yüksektir (13). Bizim çalışmamızda erişkin erkek grubuna ait ortalama değer, erişkin kadın grubunun sonucuyla kıyaslandığında anlamlı yüksek bulunmuştur. TALP aktivitesinin 20 ve 50 yaşları arasındaki erkeklerde kadınlara göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu fark iskelet kütesinin kadınlara oranla erkeklerde daha büyük olmasına bağlıdır. Daha önceki bir çalışmada her iki cinsiyette de 50 yaş üzerinde TALP aktivitesinin arttığı ve kemik ALP aktivitesinin postmenopozal kadınlarda premenopozal kadınlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (6). Bizim bulgularımız da literatürle uyumludur.

Asit fosfataz kemikte, prostatta, trombositlerde, eritrositlerde ve dalakta bulunan lizozomal bir enzimdir. Değişik izoenzimleri elektroforetik metodlarla ayrılabilir. Prostatik izoenzimin L(+) tartarata inhibe olmasına rağmen, kemik asit fosfatazı L(+) tartarata dirençlidir. Normal plazmada Tr-ACP,

plazma izoenzim 5 olarak bilinir ve osteoklastlarda sentezlendiği için kemik kaynaklı kabul edilir. Plazma Tr-ACP aktivitesinin kemik yapım-yıkımının hızlandığı metabolik kemik hastalıklarında ve ostoporozda arttığı bildirilmiştir (15,16,24). Tr-ACP aktivitelerinin postmenopozal grupta premenopozal gruba göre yüksek olması; kemik yıkımının arttığına bir göstergesidir. Tr-ACP aktivitesi kullanılan yöntemle göre değişim gösteren bir ölçümdür (16). Bizim çalışmamızda her deney grubu için elde edilen değerler kullandığımız yöntemin referans değerlerinin biraz üstünde bulunmuştur. Prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda, mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (1,22). Prolidaz eksikliği olan kişilerde, prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültürlerinde ve kan hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir (5). Prolidaz aktivitesi birçok dokuda ve amniotik sıvıda belirlenmiştir (10,12). Amniotik sıvıdaki prolidaz aktivitesinin fetal gelişim indeksi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (10). Kollajen sentezinin hızlandığı yara iyileşmesi esnasında da bu enzimin önemli rolünün olduğu düşünülmektedir (20). Bununla beraber kollajen katabolizmasının ürünü olan deoksipiridinolin kemik yapım-yıkımında bir gösterge olarak kullanıldığı halde, rutin laboratuvarında ölçümü oldukça kolay olan prolidaz aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Serum prolidaz I aktivitesinin ölçümünün kolaylıkla uygulanabilir olması ve enzim aktivitesinin sağlıklı erişkinde çok büyük değişimler göstermemesi, bu enzimin klinik laboratuvarında bir indeks olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda prolidaz I aktivitesinin postmenopozal dönemdeki kadınlarda premenopozal kadınlara göre artış göstermesinin menopoz sonrası oluşan kemik yıkımıyla bağlantılı olabileceği düşünülse de, bu konuda kesin bir değerlendirilmeye girebilmek için osteoporozu diğer klinik ve laboratuvar yöntemlerle kanıtlanmış olan hastalarda tedavi öncesi ve sonrası prolidaz I aktivitesi ölçümleri yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Arata J, Umemura S, Yamamoto Y, Hagiya M, Nohara N: Prolidase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. *Arch Dermatol* 115:62 (1979).
2. Brosset B, Myara I, Fabre M, Lemonnier A: Plasma prolidase and prolinase activity in alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 175:291 (1988).
3. Brown J, Malaval L, Chapuy M, Delmas P, Edouard C, Meunier P: Serum bone GLA-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1:1091, (1984).
4. Brown JP, Delmas PD, Arlot M, Meunier P: Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 64:954 (1987).
5. Butterworth J, Priestman DA: Presence in human cells and tissues of two prolidases and their alteration in prolidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 8:193 (1985).
6. Calvo SM, Eyre DD, Gundberg MC: Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Reviews* 17:333 (1996).
7. Casson C, Myara I, Miech G, Moatti N, Lemonnier A: Only prolidase I activity is present in human plasma. *Int J Biochem* 24:427 (1992).
8. Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19:1 (1990).
9. Delmas PD, Garnero P: Utility of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis* 55:1075 (1996).
10. Gürdöl F, Genç S, Yalçın Ö, Gültepe M: The presence of prolidase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. *Biol Neonate* 67:34 (1995).
11. Harris ET, Gertz BJ, Genant HK, Eyre DR, Survill TT, Ventura JN, DeBrock J, Ricerra E, Chesnut C.H.: The effect of short term treatment with alendronate on vertebral density and biochemical markers of bone remodeling in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1399 (1993).
12. Hui KS, Lajtha A: Prolidase activity in brain: Comparison with other organs. *J Neurochem* 30:321 (1978).
13. Kaddam S, Iqbal JS, Holland S, Wong M, Manning D: Comparison of serum osteocalcin with total and bone specific alkaline phosphatase and urinary hydroxyproline: creatinine ratio in patients with Paget's disease of bone. *Ann Clin Biochem* 31:327 (1994).
14. Kelley PJ, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA: Age and menopause-related changes in indices of bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1160 (1989).
15. Kent N.G.: Markers of bone turnover. *JIFCC* 9:31 (1997).

16. Lau WKH, Onishi T, Wergedal EJ, Singer RF, Baylink JD: Characterization and assay of tartrate resistant acid phosphatase activity in serum: Potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 33:458 (1987).
17. Lian JB, Gundberg CM: Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Rel Res* 226:267 (1988).
18. Myara I, Myara A, Mangeot M, Fabre M, Charpentier C, Lemonnier A: Plasma prolidase activity: A possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. *Clin Chem* 30:211 (1984).
19. Myara I, Miech G, Fabre M, Mangeot M, Lemonnier A: Changes in prolidase and prolidase activity during CCl₄ administration inducing liver cytolysis and fibrosis in rat. *Br J Exp Pathol* 68:7 (1987).
20. Oono T, Yasutomi H, Ohhashi T, Kodama H, Arata J: Characterization of fibroblast-derived prolidase. The presence of two forms of prolidase. *J Dermatol Sci* 1:319, (1990).
21. Öner Y, Gürdöl F, Tuğrul Y, Bekpınar S: Prolidase I activity in liver tissue: effects of ethanol and selenium. *Res Commun Alcohol Subs Abuse* 16:125 (1995).
22. Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM: A prolidase deficiency in man with iminopeptiduria. *Metabolism* 23:505 (1974).
23. Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Osishi T, Inoue T: Evaluation of bone turnover in postmenopause, vertebral fracture, and hip fracture using biochemical markers for bone formation and resorption. *J Endocrinol Invest* 20:112 (1997).
24. Tohme JF, Seibel MJ, Silverberg SJ, Robins SP, Bilezikian JP: Biochemical markers of bone metabolism. *Zeits Für Rheumatologie* 50:133 (1991).