

Stężenie metaloproteinazy 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) w surowicy chorych na twardzinę układową – porównanie z ich ekspresją w chorobowo zmienionej skórze – badania wstępne

Serum levels of metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2, MMP-9) – correlation with their expression in skin lesions in systemic sclerosis – the preliminary examination

Bożena Dzikowska-Bartkowiak¹, Agnieszka Żebrowska², Ewa Joss-Wichman², Józef Kobos³, Elżbieta Waszczykowska¹

¹Zakład Immunodermatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Waszczykowska

²Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Anna Sysa-Jędrzejowska

³Pracownia Immunopatologii, Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Pracowni: prof. dr hab. n. med. Józef Kobos

Post Dermatol Alergol 2007; XXIV, 2: 73–81

Streszczenie

W patogenezie twardziny układowej (*systemic sclerosis* – SSc) wskazuje się na udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*metalloproteinases* – MMPs).

Celem obecnej pracy było porównanie stężenia w surowicy chorych na SSc dwóch metaloproteinaz – żelatynaz MMP-2 i MMP-9 z ich ekspresją w zmienionej chorobowo skórze.

Badaniem objęto 10 chorych na twardzinę układową (6 z postacią *limited* – lSSc, i 4 z postacią *diffuse* – dSSc) oraz 10 zdrowych ochotników, stanowiących grupę kontrolną.

Stężenie MMP-2 i MMP-9 w surowicy oznaczono przy użyciu metody ELISA z wykorzystaniem zestawów firmy R&D Systems. W celu oceny ekspresji MMPs zastosowano barwienia immunohistochemiczne metodą immunoperoksydazową z pierwotnymi mysimi przeciwciałami monoklonalnymi z wykorzystaniem zestawu EnVision firmy DAKO.

Średnie stężenie MMP-2 w surowicy chorych nie różniło się w obu postaciach klinicznych twardziny (lSSc – 245,2 ng/ml vs dSSc – 248,0 ng/ml) ani w porównaniu z grupą kontrolną (SSc – 246,4 ng/ml vs 248,0 ng/ml) ($p > 0,05$).

Średnie stężenie MMP-9 w surowicy chorych było znacząco wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej (857,7 ng/ml vs 431,1 ng/ml; $p < 0,05$), nie stwierdzono istotnych różnic w obu postaciach klinicznych SSc (lSSc – 837,2 ng/ml vs dSSc 888,3 ng/ml; $p > 0,05$).

Wykazano statystycznie znaczącą, ujemną korelację pomiędzy stężeniem MMP-9 w surowicy a czasem trwania stwardnień skóry ($r = -0,860$; $p < 0,02$).

Ekspresja obu badanych metaloproteinaz w skórze chorych z SSc była silniejsza w wycinkach ze zmian chorobowych w porównaniu do stwierdzonej u osób zdrowych.

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczący udział MMPs w patogenezie twardziny układowej.

Słowa kluczowe: żelatynazy A i B, twardzina układowa, patogeneza.

Abstract

The role of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) is implicated in pathogenesis of systemic sclerosis (SSc). The aim of present study was a comparison of serum levels of two metalloproteinases %u2013 gelatinases MMP-2

and MMP-9 with their expression in lesional skin biopsies from patients with systemic sclerosis.

10 patients with systemic sclerosis (6 with limited SSc and 4 with diffuse SSc) and 10 healthy volunteers without any skin disease were examined.

Evaluation of serum levels of MMP-2 and MMP-9 was performed by ELISA method with R&D Systems. Expression of MMPs was determined by immunohistochemistry in DAKO En Vision detection system using immunoperoxidase method with mouse monoclonal antibodies.

Mean serum levels of MMP-2 were not statistically different between SSc patients and control group or both clinical types of SSc (lSSc 245.2 ng/ml vs. dSSc 248.0 ng/ml) and control group (246.4 ng/ml vs. 248.0 ng/ml) ($p > 0.05$). Mean serum level of MMP-9 was statistically higher in SSc patients compared to control group (857.7 ng/ml vs. 431.1 ng/ml; $p < 0.05$). There were no significant differences in MMP-9 mean serum levels between patients with lSSc 837.2 ng/ml vs. dSSc 888.5 ng/ml ($p > 0.05$). Statistically significant negative correlation was observed between serum concentrations of MMP-9 and duration of skin sclerosis ($r = -0.860$; $p < 0.02$).

Expression of both examined metalloproteinases was stronger in lesional skin in comparison to control group biopsies. Obtained results confirm important role of MMPs in the pathogenesis of systemic sclerosis.

Key words: gelatinases A and B, systemic sclerosis, pathogenesis.

Wprowadzenie

Patogeneza twardziny układowej jest złożona i nie do końca wyjaśniona. W rozwoju tej choroby bierze prawdopodobnie udział wiele różnych, wzajemnie na siebie oddziałujących czynników.

Nadmierne gromadzenie kolagenu w twardzinie układowej, stwierdzone nie tylko w skórze, ale również w narządach wewnętrznych (przewód pokarmowy, płuca, serce, nerki), spowodowane jest m.in. wzmożonym odkładaniem kolagenu I, III, V, VI, VII, fibronektyny i tenascyny wokół naczyń, na granicy skóry właściwej i tkanki podskórnej [1, 2].

Homeostaza tkanki łącznej w twardzinie układowej regulowana jest m.in. przez równowagę pomiędzy produkcją i degradacją składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Liczba składników macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) zależna jest od równowagi pomiędzy degradującymi je enzymami a ich tkankowymi inhibitorami. Dotychczas poznano dość dokładnie rolę tych czynników w szerzeniu się procesów nowotworowych [3–7], toczniu rumieniowatym układowym, reumatoidalnym zapaleniu stawów [8] czy tworzeniu keloidów [9].

Metaloproteiny należą do enzymów rozkładających składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, których aktywność wiąże się z obecnością aktywnych jonów cynku i wapnia. MMPs są syntetyzowane i wydzielane przez wiele różnych komórek, takich jak fibroblasty, monocyty, granulocyty, limfocyty T, dendrytyczne komórki Langerhansa, makrofagi, komórki śródbłonka, komórki nabłonkowe, mioocyty, neurony i astrocyty, a także keratynocyty [10, 11, 12]. Metaloproteiny różnią się między sobą substratami, w stosunku do których wykazują właściwości trawiące. Metaloproteinaza 2 (MMP-2) jest żelatynazą A o ciężarze cząsteczkowym 72 kDa, wykazuje zdolność degradacji kolagenu typu I, IV, V, VII, X, XI, XIV, żelatyny, elastyny, fibronektyny, agrekanu, osteonektyny, lamininy 1, 5, metaloproteinaz 1, 9, 13. Natomiast metaloproteinaza 9 (MMP-9) o ciężarze cząsteczkowym 92 kDa, zwyczajowo nazywa-

na żelatynazą B, ma zdolność trawienia kolagenu typu IV, V, VII, X, XIV, żelatyny, entaktyny, agrekanu, elastyny, fibronektyny, osteonektyny, plazminogenu oraz IL-1 β [2].

Wykazano, że zarówno metaloproteiny macierzy, jak i ich tkankowe inhibitory odgrywają istotną rolę w przebiegu procesów zapalnych [13, 14].

Dotychczasowe wyniki badań podkreślają udział metaloproteinaz w patogenezie twardziny układowej, jednakże ich rola nie została dokładnie poznana.

Celem niniejszej pracy była ocena stężenia w surowicy chorych na twardzinę układową żelatynaz – MMP-2 i MMP-9, a także ich ekspresji w chorobowo zmienionej skórze, oraz porównanie z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej.

Materiał i metody

Pacjenci

Do grupy badanej zakwalifikowano 10 chorych z twardziną układową, 6 z postacią ograniczoną – *limited* SSc (lSSc), i 4 z postacią uogólnioną choroby – *diffuse* SSc (dSSc). Wśród pacjentów było 9 kobiet i 1 mężczyzna, średni wiek chorych wynosił 54,4 roku (38–72 lat). Rozpoznanie choroby postawiono w oparciu o kryteria diagnostyczne twardziny układowej Amerykańskiego Instytutu Reumatologii (*American College of Rheumatology* – ACR) [15]. Stopień stwardnienia skóry oceniano za pomocą skali punktowej wg Kahaleha i wsp. [16].

Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych ochotników (5 kobiet i 5 mężczyzn), w wieku 19–49 lat (średni wiek 42 lata).

U wszystkich pacjentów przeprowadzono podstawowe badania laboratoryjne, w tym odczyn Biernackiego, morfologię, badanie ogólne moczu oraz poziom mocznika i kreatyniny. Wykonano ponadto badania specjalistyczne: scyntyografię przetyku, 24-godzinne badanie EKG (holter), echokardiografię metodą Dopplera, zdjęcie RTG klat-

ki piersiowej, kości stóp i rąk oraz badanie spirometryczne. Obecność przeciwciał przeciwjądrowych (*antinuclear antibodies* – ANA) w surowicy oceniano, stosując metodę pośredniej immunofluorescencji (*indirect immunofluorescence* – IIF) z wykorzystaniem komórek HEp-2 jako substratu (Sigma Diagnostics). Szczegółowe określenie rodzaju przeciwciał przeprowadzono za pomocą metody podwójnej immunodifuzji (*double immunodiffusion* – DID) w żelu agarowym wg Ouchterlony'ego [17].

Przed rozpoczęciem oznaczeń wszyscy pacjenci oraz osoby z grupy kontrolnej wyrazili pisemną świadomą zgodę na udział w badaniu. Projekt badawczy uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Charakterystyka chorych

Średni czas trwania objawu Raynauda wyniósł 9,7 roku (w zakresie od 4 do 20 lat), a czas utrzymywania się stwardnień skóry – 5,4 roku (od 1 do 15 lat). Średni stopień nasilenia zmian skórnych (*Total Skin Score* – TSS) to 15 pkt, w zakresie od 10 do 28 pkt. Procesem chorobowym objętych było 1–3 narządów wewnętrznych. Przeciwciała Scl 70 stwierdzono w surowicy 5 z 10 chorych na twardzinę układową, obecność przeciwciał U3RNP – w 1 przypadku podtypu ISSc twardziny; u 4 pozostałych chorych występowały inne, nieswoiste przeciwciała przeciwjądrowe.

Surowica

Pobrane próbki surowicy były natychmiast zamrażane w temp. -20°C . Określenie stężeń MMP-2 i MMP-9 przeprowadzono z wykorzystaniem metody immunoenzymatycznej ELISA.

Badania tkankowe

Wycinki ze skóry chorobowo zmienionej ($n=10$) utrwalono w formalinie i zatopiono w bloczkach parafinowych. Pobrano ponadto wycinki ze skóry przedramion od 10 zdrowych ochotników, dobranych odpowiednio do osób z grupy badanej pod względem płci i wieku.

Immunohistochemia

Skrawki zatopione w parafinie (o grubości 3–4 μm) poddano rutynowemu barwieniu hematoksyliną i eozyną oraz barwieniu immunohistochemicznemu z zastosowaniem systemu DAKO EnVision metodą immunoperoxydazową. Zastosowano mysie przeciwciała monoklonalne anty-MMP-2 i anty-MMP-9 (Novocastra). W celu wykonania barwień immunohistochemicznych skrawki zatopione w parafinie umieszczono na szkiełkach adhezyjnych i suszono przez 24 godz. w temperaturze 56°C . W następnym etapie skrawki poddano odparafinowaniu w szeregu ksylenów i alkoholi o zmniejszających się stężeniach (96, 80, 70 i 60%). Aktywność endogennej peroksydazy

zahamowano, zanurzając skrawki w 3% roztworze nadtlenku wodoru w metanolu.

W celu odzyskania antygeniczności tkanek i umożliwienia ich reakcji z przeciwciałami zastosowano swoiste procedury dla każdego przeciwciała, zgodnie z zaleceniami producenta. Po 60-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej z rozcieńczonymi przeciwciałami, szkiełka 3-krotnie przemyto w buforze TRIS. Następnie zastosowano system podwójnej wizualizacji DAKO EnVision w celu uwidocznienia reakcji antygen-przeciwciała. W przypadkach, w których wystąpił dodatni odczyn w barwieniu immunohistochemicznym, podbarwiano jądra komórkowe hematoksyliną Meyera przez 2 min. Po odwodnieniu i przeprowadzeniu przez szereg acetonów i ksylenów, podobnie jak opisano powyżej, utrwalono szkiełką w balsamie kanadyjskim.

Do oceny stopnia intensywności reakcji immunohistochemicznej zastosowano 3-stopniową skalę półilościową:

- I stopień (słaby odczyn) – reakcja immunohistochemiczna była ograniczona do pojedynczych komórek nabłonka i/lub występowała tylko ogniskowo w podścielisku,
- II stopień (umiarkowany odczyn) – reakcja barwna występowała w części komórek nabłonkowych i/lub w niektórych obszarach podścieliska,
- III stopień (silny odczyn) – reakcja immunohistochemiczna zachodziła w licznych komórkach nabłonka i/lub w dużych obszarach podścieliska.

Ekspresję MMPs oceniano dwiema niezależnymi patologiami przy użyciu mikroskopu Nikon Microfob FXA (Nikon LTD, Japonia) w powiększeniu 100 razy.

Analiza statystyczna

Dla cech mierzalnych podano zakresy (minimum-maksimum), przeliczono wartości przeciętne – średnie arytmetyczne, medianę. Obliczono wewnętrzne zróżnicowanie cech za pomocą odchylenia standardowego. Rozkład badanych zmiennych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Wartości przeciętne w analizowanych grupach porównywano, wykorzystując test Manna-Whitneya. Zależności pomiędzy dwiema cechami mierzalnymi oceniano, wykorzystując współczynnik rang Spearmana – ρ . We wszystkich porównaniach poziom istotności ustalono dla $p < 0,05$.

Wyniki

Czas trwania objawu Raynauda wyniósł w całej grupie SSc 4–20 lat (średnio 9,7 roku), w podgrupie ISSc 7–20 lat (średnio 11,5 roku), w dSSc 4–10 lat (średnio 7 lat). Czas trwania choroby wyniósł w grupie chorych z SSc – od roku do 16 lat (średnio 5,4 roku), w ISSc od roku do 16 lat (średnio 6,3 roku), a w dSSc 3–5 lat (średnio 4 lata). Stopień stwardnienia skóry *Total Skin Score* (TSS) to w SSc 10–28 pkt (średnio 15 pkt), w ISSc 10–16 pkt (średnio 12 pkt), a w dSSc 12–28 pkt (średnio 19,5 pkt) (tab. 1.).

W tab. 2. i 3. przedstawiono wyniki oznaczenia stężeń MMP-2 i MMP-9 w surowicy badanych pacjentów.

Średnie stężenie MMP-2 w surowicy badanych chorych nie różniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną (246,4 ng/ml vs 248,0 ng/ml). Porównanie średnich wartości stężenia MMP-2 w surowicy chorych z obu postaciami klinicznymi również nie wykazało różnic – w podgrupie z *limited* SSc wynosiło 245,2 ng/ml, a w *diffuse* SSc – 248,0 ng/ml (tab. 4.).

Wykazano, że średnie stężenie MMP-9 w surowicy w badanej grupie chorych było statystycznie wyższe 857,7 ng/ml w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej: 431,1 ng/ml ($p < 0,05$). U 5 chorych (3 z *limited* SSc i 2 z *diffuse* SSc) stwierdzono podwyższone stężenie MMP-9 (953–2306 ng/ml) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej (169–705 ng/ml). Porównanie wartości średnich stężenia MMP-9 w surowicy chorych z postacią *limited* SSc (837,2 ng/ml) i dSSc (888,5

ng/ml) nie wykazało różnic statystycznie znamiennej ($p > 0,05$) (tab. 4.).

Badanie immunohistochemiczne ujawniło ekspresję MMP-2 w okolicy naczyń krwionośnych i w skórze właściwej w 9 wycinkach, w tym w 2 wycinkach obecna była również w komórkach warstwy podstawnej naskórka (ryc. 1.). W 1 wycinku ekspresja zlokalizowana była tylko w skórze właściwej i komórkach warstwy podstawnej naskórka. Ekspresja ta była silnego (6 wycinków) lub średniego stopnia (4 wycinki) (tab. 3.). Ekspresja MMP-9 w skórze obserwowana w okolicy naczyń krwionośnych i w komórkach warstwy podstawnej naskórka w 8 wycinkach była średnio nasiloną (ryc. 2.), w tym w 3 wycinkach obecna również w skórze właściwej (tab. 3.).

Ekspresję MMP-2 i MMP-9 w 10 wycinkach pobranych od zdrowych ochotników oceniano przy użyciu tych samych metod. We wszystkich skrawkach wykazano umiarkowaną ekspresję obu białek tylko w nielicznych

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna badanych osób

	Twardzina układowa (SSc)	Limited SSc	Diffuse SSc	Grupa kontrolna
liczba badanych	10	6	4	10
płeć (K/M)	9/1	6/0	3/1	5/5
wiek (lata)	38–72 (54,4)	38–72 (54,4)	42–52 (47)	19–49 (42)
czas trwania objawu Raynauda (lata)	4–20 (9,7)	7–22 (11,5)	4–10 (7)	0
czas trwania choroby (lata)	1–16 (5,4)	1–16 (6,3)	3–5 (4)	0
Total Skin Score (TSS) – punkty	10–28 (15)	10–16 (12)	12–28 (19,5)	0

Tab. 2. Stężenie metaloproteinazy 2 i metaloproteinazy 9 w surowicy chorych na twardzinę układową

Lp.	Postać SSc	Płeć	Czas trwania objawu Raynauda (lata)	Czas trwania stwardnień skóry (lata)	TSS (pkt)	MMP-2 w surowicy (ng/ml)	MMP-9 w surowicy (ng/ml)
1.	ISSc	K	8	1	10	237,5	2306
2.	ISSc	K	20	16	10	241,1	116
3.	ISSc	K	10	6	12	292,5	327
4.	ISSc	K	9	7	12	216,3	358
5.	ISSc	K	15	6	16	179,3	953
6.	ISSc	K	7	2	12	304,7	963
7.	dSSc	K	4	3	28	213,5	1064
8.	dSSc	M	7	5	16	181,2	569
9.	dSSc	K	10	4	22	321,7	1328
10.	dSSc	K	7	4	12	275,7	593

Tab. 3. Ekspresja metaloproteiny 2 i metaloproteiny 9 w skórze pacjentów z twardziną układową

Lp.	Postać SSc	Płeć	MMP-2 w skórze			MMP-9 w skórze		
			naczynia, skóra	naczynia, skóra, warstwa podstawna naskórka	skóra, warstwa podstawna naskórka	naczynia, warstwa podstawna naskórka	naczynia, skóra warstwa podstawna naskórka	warstwa podstawna naskórka
1.	ISSc	K			+++	++		
2.	ISSc	K	+++					++
3.	ISSc	K	+++			++		
4.	ISSc	K		++			++	
5.	ISSc	K	+++			++		
6.	ISSc	K	++				+++	
7.	dSSc	K	++				++	
8.	dSSc	M	++			++		
9.	dSSc	K		+++		++		
10.	dSSc	K	+++					++

Tab. 4. Analiza statystyczna uzyskanych wyników w grupie badanych pacjentów i osób zdrowych

Dane statystyczne	MMP-2 (ng/ml)			
	Postać twardziny			grupa kontrolna N=10
	twardzina układowa (SSc) N=10	limited SSc (ISSc) N=6	diffuse SSc (dSSc) N=4	
zakres	179,3–321,7	179,3–304,7	181,2–321,7	117–410
mediana	239,3	239,3	244,6	242
średnia ± SD	246,4±50,4	245,2±47	248,0±62,9	248,0±105,3
MMP-9 (ng/ml)				
zakres	116–2306	116–2306	569–1328	169–705
mediana	773	655,5	828,5	445,5
średnia ± SD	857,7±433,9*	837,2±799,6	888,5±371,2	431,1±185,6

N – liczba badanych

SD – odchylenie standardowe

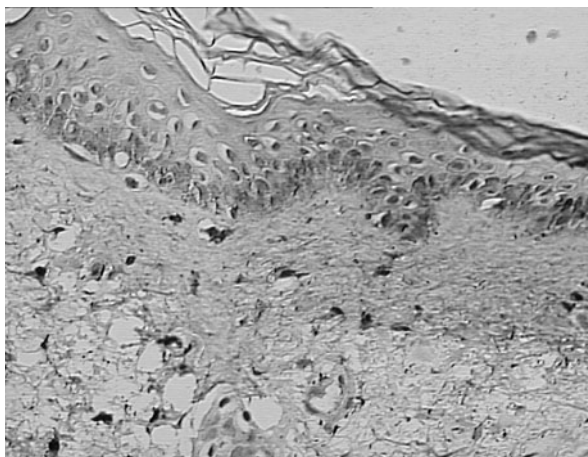
* – różnice statystycznie istotne w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,05$)

Tab. 5. Zależności pomiędzy stężeniem metaloproteiny 2 i metaloproteiny 9 a czasem trwania objawu Raynauda, czasem trwania i stopniem stwardnienia skóry

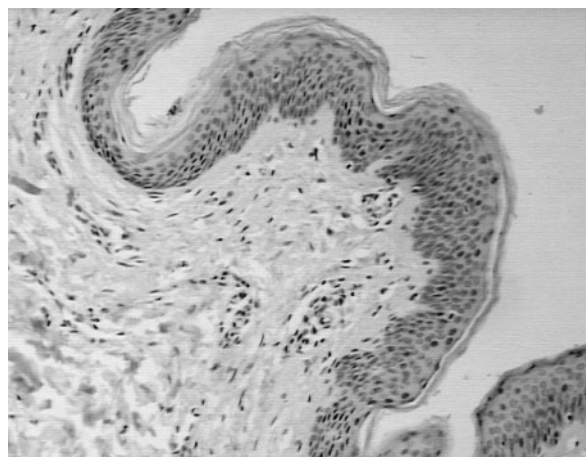
Badana metaloproteinaza	Czas trwania objawu Raynauda		Czas trwania stwardnień skóry		Stopień stwardnienia skóry (TSS)	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p
MMP-2	0,092		0,226		0,220	
	$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p > 0,05$	
MMP-9	0,394		0,860		0,334	
	$p > 0,05$		0,001423		$p > 0,05$	

ρ – współczynnik korelacji rang Spearmana

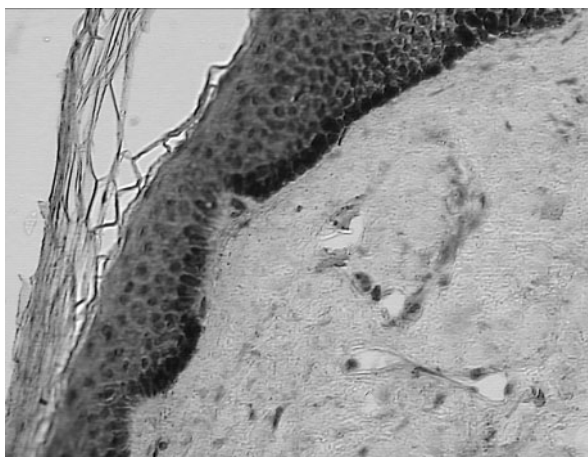
p – poziom istotności



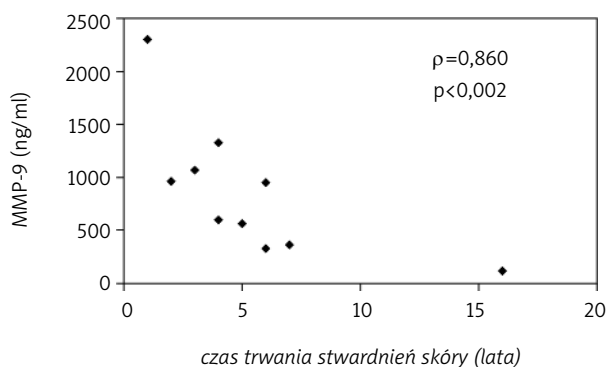
Ryc. 1. Intensywna ekspresja MMP-2 w okolicy naczyń krwionośnych i w skórze właściwej (powiększenie 100 razy)



Ryc. 3. Umiarkowana ekspresja obu białek w nielicznych keratynocytach warstwy podstawnej w wycinku z grupy kontrolnej (powiększenie 100 razy)



Ryc. 2. Średnio nasiloną ekspresja MMP-9 w okolicy naczyń krwionośnych i w komórkach warstwy podstawnej naskórka (powiększenie 100 razy)



Ryc. 4. Zależność pomiędzy stężeniem metaloproteiny 9 w surowicy badanych chorych a czasem trwania stwardnień skóry

keratynocytach warstwy podstawnej naskórka (ryc. 3.). W 4 wycinkach stwierdzono słabą ekspresję badanych metaloproteinaz w okolicy mieszków włosowych.

U chorych ze stężeniem MMP-9 w surowicy mieszczącym się w granicach podobnych, jak u osób zdrowych, średni czas trwania objawu Raynauda wynosił 10,6 roku, a u pacjentów z wyższymi stężeniami MMP-9 w surowicy wynosił 8,8 roku. Średni czas trwania stwardnień skóry w obu podgrupach wynosił – u chorych z podwyższonymi stężeniami MMP-9 w surowicy – 3,2 roku, a u chorych z wartościami w granicach podobnych, jak w grupie kontrolnej – 7,6 roku. Stopień stwardnienia skóry u chorych z podwyższonymi wartościami MMP-9 wynosił śred-

nio 17,6 pkt, a w podgrupie z niższymi wartościami MMP-9 w surowicy średnio – 12,4 pkt (tab. 2.).

Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy stężeniem metaloproteiny 9 a czasem trwania stwardnień skóry; wartość ta obniżała się wraz z czasem trwania choroby ($\rho = -0,860$, $p < 0,02$) (tab. 5., ryc. 4.). Pozostałe zależności nie były statystycznie znamienne.

Omówienie wyników i dyskusja

W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej informacji o czynnikach wpływających na skład macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzenie równowagi pomiędzy czynni-

kami degradującymi składniki ECM a ich inhibitorami odgrywa rolę w patogenezie wielu schorzeń. Wykazano, że zwiększona ekspresja szeregu metaloproteinaz związana jest z progresją nowotworów [3–7, 18], rozwojem włóknienia mięśnia sercowego w izolowanej stenozie aortalnej [19], chorób naczyń mózgowych [20, 21], cukrzycy typu 1 [22, 23], alergicznego nieżytu nosa [24], reumatoidalnego zapalenia stawów [8,25,26], tocznia rumieniowatego układowego [27], a także tworzeniem keloidów [9, 28]. Zmniejszenie ekspresji MMP-13 obserwowano natomiast w endometriozie [29]. W chorobach pęcherzowych, takich jak pemfigoid i *dermatitis herpetiformis* wykazano, że metaloproteiny – zarówno rozpuszczalne, jak i związane z błoną komórkową – biorą udział w degradacji błony podstawnej, dlatego też mogą być przyczyną tworzenia się zmian o charakterze pęcherzy.

Proces włóknienia w przebiegu twardziny układowej ma wieloczynnikowe podłoże i jest wynikiem nie tylko procesu zapalnego czy zaburzeń immunologicznych i naczyniowych, ale również nadmiernego wytwarzania, odkładania kolagenu i innych składowych ECM w tkance łącznej. Wyniki badań wielu autorów wskazują na udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w tym procesie [10, 30–32]. Do grupy enzymów degradujących składniki ECM należą kolagenazy, żelatynazy, elastazy, stromelizyny i metaloproteiny typu błonowego [33]. Istotny wpływ na skład macierzy zewnątrzkomórkowej mają m.in. żelatynazy – metaloproteiny 2 (MMP-2) i 9 (MMP-9), które degradują zdenaturowany kolagen i składniki błony komórkowej [22, 34]. MMP-2, produkowana przez fibroblasty i makrofagi, rozszczepia żelatynę, kolagen typu VI, fibronektyny i proteoglikany [10]. Metaloproteiny 9 w zdrowych tkankach wraz z innymi enzymami wpływa na prawidłową przemianę kolagenu typu IV, V, elastyny i zdenaturowanego kolagenu.

W przebiegu procesów zapalnych wykazano, że w wyniku stymulacji cytokin prozapalnych dochodzi do nadmiernego wydzielania metaloproteinaz, w tym MMP-9, w komórkach nacieku zapalnego [35]. Badania doświadczalne przeprowadzone na myszach wykazały także, że MMP-9 odgrywa rolę w przebiegu angiogenezy [36], jak również w rozwoju *glomerulosclerosis* [37], *encephalomyelitis* [38], tętniaka aorty [39] i w zawale serca [40].

Produkcja metaloproteinaz regulowana jest przez cytokiny, czynniki wzrostu, reakcje komórka-komórka i komórka-macierz, a także procesy kontrolujące ekspresję genów i aktywację ich proenzymatycznych form. Swoiste inhibitory tkankowe wpływają również na aktywność MMPs.

Dotychczasowe badania zmierzające zarówno do określenia znaczenia metaloproteinaz w patogenezie twardziny układowej, jak i oznaczania ich stężenia w ocenie aktywności choroby prowadzone były jedynie na podstawie określenia ich stężeń w surowicy lub ekspresji w hodowlach fibroblastów pochodzących od badanych pacjentów. Ich wyniki nie są jednoznaczne. Kikuchi i wsp. [41] wykazali, że stężenie metaloproteiny 9 (MMP-9) było staty-

stycznie niższe w surowicy chorych na twardzinę układową w porównaniu z grupą kontrolną, a także niższe w postaci dSSc niż ISSc. Autorzy stwierdzili również ujemną korelację ze stopniem stwardnienia skóry. Nie stwierdzono jednakże zależności pomiędzy jej stężeniem a stężeniem inhibitora – TIMP-1. Bogaczewicz i wsp. [42] wykazali, że w surowicy chorych na twardzinę układową zarówno typu dSSc, jak i ISSc stężenie metaloproteiny 9 było wysokie. Obserwowali również wyższe stężenie tej metaloproteiny w surowicy osób chorujących krócej niż u pacjentów w późniejszym etapie choroby, dlatego też wysunięto hipotezę o możliwości odzwierciedlenia dynamizmu procesu przemian ECM w SSc za pomocą oznaczania stężeń tej metaloproteiny. Autorzy nie stwierdzili natomiast istotnego związku pomiędzy występowaniem zmian narządowych a wysokim stężeniem MMP-9 w surowicy badanych chorych.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że stężenia w surowicy badanych chorych metaloproteiny 2 były porównywalne, a metaloproteiny 9 – znacznie wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej.

Kobayashi i wsp. (2003) wykazali, że żelatynazy – metaloproteiny 2 i 9, wydzielane przez fibroblasty mogą odgrywać ważną rolę w zapaleniu indukowanym przez cytokiny i metabolizmie tkankowym [43]. Enzymy te mogą brać udział w aktywacji latentnej formy TGF- β – cytokiny, której przypisuje się również istotne znaczenie w patogenezie twardziny układowej [18]. Badania Giannelli i wsp. (2005) wskazują natomiast, że obniżone stężenie metaloproteiny 9 w większym stopniu odzwierciedla zaburzenia w pierwotnym nadciśnieniu płucnym u chorych z SSc [44].

W badaniach autorów niniejszej pracy w wycinkach skóry pochodzących od chorych na twardzinę układową stwierdzono wyraźną ekspresję metaloproteinaz 2 i 9 w porównaniu z wycinkami pochodzącymi od osób zdrowych. Ekspresja MMP-2 zlokalizowana była w skórze właściwej i naczyniach krwionośnych, natomiast MMP-9 w większości badanych wycinków stwierdzana była w naskórku i w naczyniach krwionośnych skóry właściwej. Wykazano, że charakter ekspresji MMP-2 był silny, a MMP-9 średni. Można przypuszczać, że obecność zwiększonej ekspresji większości badanych metaloproteinaz w naczyniach krwionośnych skóry właściwej potwierdza ich znaczącą rolę w degradacji składników podścieliskowej błony podstawnej, co ułatwia przenikanie limfocytów T do tkanek otaczających i daje możliwość ich pośredniego wpływu na zwiększoną produkcję składników ECM przez fibroblasty. Badania innych autorów wskazują, że ekspresja żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) ułatwia limfocytom T przekraczanie podścieliskowej błony podstawnej [45]. Pobudzone limfocyty mogą na drodze interakcji komórka-komórka w bezpośredni sposób indukować ekspresję MMP-9 w fibroblastach [46], neutrofilach [47] i monocytach [48].

W przeprowadzonych obecnie badaniach nie stwierdzono związku pomiędzy nasileniem ekspresji metaloproteinaz 2 i 9 a czasem trwania choroby, chociaż znane są wyniki badań potwierdzających istnienie takich zależności w stosunku do surowicznych stężeń metaloproteinaz. Kuroda i Shinkai (1997) wykazali zależność ekspresji genów metaloproteinaz związaną z czasem trwania choroby (badania przeprowadzone *in vitro* – porównanie fibroblastów pobranych od chorych na twardzinę i prawidłowych fibroblastów) [49]. Ekspresja MMP była większa w fibroblastach pobranych od pacjentów chorujących krócej niż rok; w przypadku pacjentów chorujących dłużej (2–4 lata) poziom m-RNA MMP-1, MMP-2 i MMP-3 był niski. W fibroblastach osób chorujących ponad 6 lat ekspresja MMP nie różniła się od ekspresji stwierdzonej u osób zdrowych.

W twardzinie układowej nie można jednak dokładnie wyjaśnić mechanizmu zaburzeń równowagi pomiędzy metaloproteinazami i ich tkankowymi inhibitorami doprowadzających do nadmiernego włośnienia. Sugeruje się, że nadmierna produkcja ECM może być również wynikiem zahamowania aktywności MMPs. Badania niektórych autorów wskazują na udział w tym procesie przeciwciał skierowanych przeciwko metaloproteinazom 1 i 3, które stwierdzono w surowicy chorych na twardzinę układową [50, 51].

Potwierdzeniem hipotezy o wpływie MMPs i TIMPs na skład ECM nie tylko poprzez regulację ich wytwarzania przez fibroblasty, ale również przez ich znaczenie w rozwoju zapalenia może być fakt, iż w badanych wycinkach skóry pochodzących od chorych na twardzinę układową stwierdzono wyraźną ekspresję MMP-2 w komórkach nacieku zapalnego – eozynofilach i neutrofilach. Najbardziej intensywny charakter miała ekspresja MMP-2.

Uzyskane wyniki potwierdzają dotychczasowe obserwacje, wskazujące na znaczący udział zaburzeń równowagi pomiędzy czynnikami degradującymi składniki macierzy zewnątrzkomórkowej a ich inhibitorami w rozwoju włośnienia tkankowego w twardzinie układowej.

Praca badawcza była finansowana z funduszy prac statutowych Nr 503-8019-1; 503-1019-1, oraz pracy własnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi 502-18-344. Szczególne podziękowania za pomoc techniczną pragniemy złożyć paniom Grażynie Jastrzębskiej i Stanisławie Madalińskiej.

Piśmiennictwo:

- Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 187-99.
- Bogaczewicz J, Chodorowska G, Krasowska D. Rola metaloproteinaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w progresji nowotworów skóry a nowe strategie farmakologicznej inhibicji metaloproteinaz macierzy. *Przeg Dermatol* 2004; 91: 153-60.
- Graesslin O, Cortez A, Uzan C, et al. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1911-17.
- Pesta M, Holubec LJr, Topolcan O, et al. Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res* 2005; 25: 3387-91.
- Gu ZD, Li JY, Li M, et al. Matrix metalloproteinases expression correlates with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1835-43.
- Bjornland K, Flatmark K, Pettersen S, et al. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J Surg Res* 2005; 127: 151-6.
- Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 541-5.
- Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2005; 73: 29-36.
- Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol* 2005; 153: 295-300.
- Yazawa N, Kikuchi K, Ihn H, et al. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 70-5.
- Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, et al. Epsilon (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 14-21.
- Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Werner S. Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5242-54.
- Carmichael DF, Stricklin GP, Stuart JM. Systemic administration of TIMP in the treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Agents Actions* 1989; 27: 378-9.
- Lee MM, Yoon BJ, Osiewicz K, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates resistance to infection. *Infect Immun* 2005; 73: 661-5.
- Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
- Kahaleh MB, Sultany GL, Smith EA, et al. A modified scleroderma skin scoring method. *Clin Exp Rheumatol* 1986; 4: 367-69.
- Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: *Progress in Allergy*. Callos P, Waxman BH (eds.). Karger, New York 1962; V: 30.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163-76.
- Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997; 122: 264-71.
- Van den Steen PE, Van Aelst I, Starckx S, et al. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. *Lab Invest* 2006; 86: 873-88.
- Krizanac-Bengez L, Hossain M, Fazio V, et al. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic *in vitro* blood-brain barrier model: role of pro-inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291: C740-9.
- Annala A, Koivukangas V, Salmela P, et al. Collagen synthesis markers and matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) and 9 (MMP-9) in the suction blister fluid and serum of juvenile diabetic patients. *Eur J Dermatol* 1995; 5/3: 247-52.

23. Chung AW, Hsiang YN, Matzke LA, et al. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circ Res* 2006; 99: 140-8.
24. Kostamo K, Sorsa T, Leino M, et al. In vivo relationship between collagenase-2 and interleukin-8 but not tumour necrosis factor-alpha in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy* 2005; 60: 1275-9.
25. Abeles AM, Pillinger MH. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis – cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006; 64: 20-4.
26. Fiedorczyk M, Klimiuk PA, Sierakowski S, et al. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33: 1523-9.
27. Toubi E, Kessel A, Grushko G, et al. The association of serum matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor levels with scleroderma disease severity. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 221-4.
28. Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol* 2005; 153: 295-300.
29. Laudanski P, Szamatowicz J, Ramel P. Matrix metalloproteinase-13 and membrane type-1 matrix metalloproteinase in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2005; 21: 106-10.
30. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, et al. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 359-63.
31. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 281-94.
32. Mattila L, Airola K, Ahonen M, et al. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 416-21.
33. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6: 199-213.
34. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 236-40.
35. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival cervical fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1127-32.
36. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-22.
37. Fornoni A, Wang Y, Lenz O, et al. Association of a decreased number of d (CA) repeats in the matrix metalloproteinase-9 promoter with glomerulosclerosis susceptibility in mice. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2068-76; erratum in: *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2617.
38. Dubois B, Masure S, Hurtenbach V, et al. Resistance of young gelatinase-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest* 1999; 104: 1507-15.
39. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000; 105: 1641-9.
40. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000; 106: 55-62.
41. Kikuchi K, Kubo M, Hoashi T, et al. Decreased MMP-9 activity in the serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 301-5.
42. Bogaczewicz J, Krasowska D, Stryjecka-Zimmer M, Chodorowska G. High serum total concentration of matrix metalloproteinase-9 (pro-MMP-9 i MMP-9) in patients with systemic sclerosis. *Przegl Dermatol* 2005; 3: 217-23.
43. Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases -2 and -9 are secreted from human fibroblasts. *Acta Derm Venereol* 2003; 83: 105-7.
44. Giannelli G, Iannone F, Marinosci F, et al. The effect of bosentan on matrix metalloproteinase-9 levels in patients with systemic sclerosis-induced pulmonary hypertension. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 327-32.
45. Leppert D, Waubant E, Galardy R, et al. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 1995; 154: 4379-89.
46. Burger D, Rezzonico R, Li JM, et al. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1748-59.
47. Zhang JH, Ferrante A, Arrigo AP, et al. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes. *J Immunol* 1992; 148: 177-81.
48. Lacraz S, Isler P, Vey E, et al. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994; 269: 22027-33.
49. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 567-72.
50. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, et al. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 4: 542-7.
51. Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, et al. Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 357-63.