

Received: 2008.01.09
Accepted: 2008.07.25
Published: 2008.09.03

Udział metaloproteinaz macierzy w patogenezie cukrzycy i rozwoju retinopatii cukrzycowej*

The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of diabetes mellitus and progression of diabetes retinopathy

Julia Naduk-Kik, Elżbieta Hrabec

Zakład Enzymologii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Metaloproteinazy macierzy (MMP) stanowią rodzinę ponad 20 strukturalnie spokrewnionych endopeptydaz zależnych od cynku i aktywowanych przez jony wapnia. Reprezentanci tej rodziny są zdolni do degradacji większości białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM); degradując ECM, w tym błony podstawne, MMP biorą udział w przebudowie tkanek i migracji komórek. Spośród metaloproteinaz macierzy MMP-2 i MMP-9 są szczególnie aktywne w degradacji kolagenu typu IV, będącego głównym składnikiem błon podstawnych. MMP są również zdolne do cięcia białek niebędących składnikami ECM, w tym: cytokin, chemokin i czynników wzrostu.

MMP i ich inhibitory (TIMP) odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak embriogeneza czy gojenie ran, jednak te same enzymy włączone są w patogenezę wielu chorób, m.in. nowotworów i miażdżycy. W wymienionych stanach patologicznych równowaga między MMP a TIMP jest przesunięta na korzyść MMP, co powoduje nadmierną degradację ECM. Wyniki ostatnich badań wskazują, że metaloproteinazy uczestniczą również w patogenezie cukrzycy i powikłań cukrzycowych, takich jak retinopatia cukrzycowa. MMP-9 jest zdolna do degradacji insuliny, a ponadto może również aktywować IL-8, głównego chemoatraktanta w stosunku do neutrofilów i monocytów. Poza tym MMP-9, przez niszczenie błon podstawnych, umożliwia migrację komórek zapalnych i kolonizację trzustki. Warunkiem wystąpienia angiogenezy (retinopatia cukrzycowa) jest zależna od kolagenaz typu IV degradacja ECM, w tym błon podstawnych. Enzymy te mogą również degradować czynnik wywodzący się z nabłonka barwnikowego siatkówki – główne antyangiogenne białko oka.

Słowa kluczowe:

metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej • MMP-9 • MMP-2 • cukrzyca • retinopatia cukrzycowa • mikroangiopatia • kolagenazy typu IV • angiogeneza

Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise a family of over 20 structurally related proteins which are zinc-dependent and calcium-activated endopeptidases. The members of this family are able to degrade most extracellular matrix (ECM) proteins and are thus involved in tissue remodeling and contribute to cell migration by eliminating extracellular matrix and basement membrane barriers. Of the MMPs, MMP-2 and MMP-9 are especially active in the degradation of

* Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego 502-11-566, finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

type IV collagen, the main constituent of the basement membrane. MMPs also cleave a variety of non-ECM proteins, including cytokines, chemokines, and growth factors. MMPs and their inhibitors (TIMPs) play important roles in physiological processes such as embryogenesis and wound healing; however, these enzymes are also involved in the pathogenesis of many diseases, such as cancer and atherosclerosis. In these pathological conditions the balance between MMPs and TIMPs shifts in favor of MMPs, resulting in excessive degradation of ECM. Research results published recently show that these enzymes can also be involved in the pathogenesis of diabetes mellitus and diabetic complications such as diabetic retinopathy. MMP-9 has the ability to degrade insulin and is able to activate IL-8, the main chemoattractant factor for neutrophils and monocytes. In addition, MMP-9 enables inflammatory cell migration and pancreas colonization by eliminating the basement membrane barriers. Type IV collagenases are also important for endothelial cell invasion occurring during neovascularization (diabetic retinopathy), as angiogenesis needs extracellular matrix degradation; what is more, these enzymes are able to degrade pigment epithelium-derived factor, which is the principal antiangiogenic protein of the eye.

Key words: matrix metalloproteinases • MMP-2 • MMP-9 • diabetes mellitus • diabetic retinopathy • microangiopathy • collagenases type IV • angiogenesis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=868195>

Word count: 4054

Tables: –

Figures: 1

References: 69

Adres autorki: mgr Julia Naduk-Kik, Zakład Enzymologii Medycznej, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: julia.naduk@wp.pl

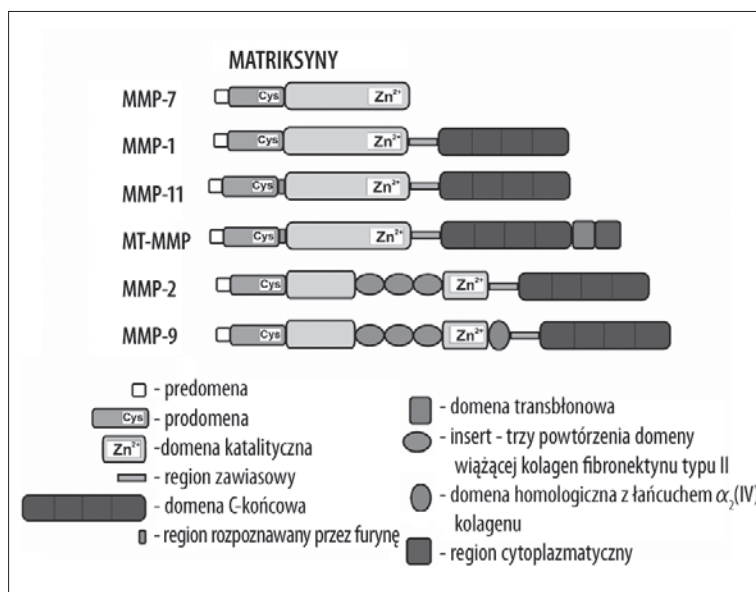
1. WSTĘP

Cukrzyca jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń metabolicznych, a u podłoża jej rozwoju leży wiele czynników genetycznych, środowiskowych oraz związanych ze stylem życia. Niedobór insuliny w cukrzycy typu 1 zazwyczaj jest następstwem uszkodzenia komórek β wysepek Langerhansa przez układ odpornościowy (cukrzyca autoimmunologiczna) [15]. Znacznie częściej występująca cukrzyca typu 2 jest spowodowana zaburzonym wydzielaniem i działaniem insuliny w tkankach (insulinooporność). Do grupy czynników ryzyka wystąpienia cukrzycy można zaliczyć: otyłość, małą aktywność fizyczną, nieprawidłową dietę, obciążenia rodzinne oraz wiek powyżej 45 lat [61]. Poza ostrymi zaburzeniami metabolicznymi w przebiegu cukrzycy dochodzi do rozwoju powikłań o charakterze przewlekłym, takich jak: mikroangiopatie i makroangiopatie. Skutkiem podwyższonego stężenia glukozy we krwi mogą być uszkodzenia naczyń krwionośnych, nerwów oraz wielu narządów wewnętrznych. Ponadto, wysoki poziom glukozy we krwi przyczynia się do rozwoju dyslipidemii, powszechnie występującej w cukrzycy typu 2. Sprzyja to rozwojowi makroangiopatii – obejmującej chorobę naczyniową mózgu, chorobę niedokrwienną serca, chorobę naczyniową kończyn dolnych oraz mikroangiopatii, w której zmiany dotyczą drobnych naczyń krwionośnych w obrębie siatkówki (retinopatia cukrzycowa), nerek (nefropatia cukrzycowa) oraz tkanki nerwowej (neuropatia cukrzycowa) [12,28,61]. Bez wątpienia, zarówno nacisk położony na edukację chorych, jak i ciągły postęp w farmakoterapii przyczyniły się do wydłużenia czasu przeżycia pacjentów, ale długość trwania choroby jest właśnie jednym z głównych czynników sprzyjających rozwojowi mikro- i makroangiopatii. Mechanizm rozwoju tych powikłań jest obecnie przedmiotem intensywnych badań [28].

2. KOLAGENAZY TYPU IV – MMP-2 I MMP-9

Do czynników mogących sprzyjać rozwojowi cukrzycy, ale przede wszystkim włączonych w patogenezę towarzyszących jej zmian naczyniowych, należą metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) (matrix metalloproteinases i matriksyny). Odkryto i scharakteryzowano już ponad 20 różnych MMP, ale na szczególną uwagę zasługują dwa enzymy z tej rodziny – metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9 lub inaczej żelatynaza A i żelatynaza B), należące do kolagenaz typu IV.

Oto krótka systematyka i charakterystyka rodziny MMP. Spośród endoproteinaz wymagających jonów metali do katalizy (metaloproteinaz) wydzielona została nadrodzina metzincyn (metzincin), grupująca enzymy mające dwie wspólne cechy: konserwatywny motyw sekwencyjny, zawierający trzy reszty histydylowe wiążące jon cynku w centrum aktywnym oraz konserwatywną resztę metioniny, umiejscowioną poniżej miejsca wiązania katalitycznego cynku. Reprezentantów metzincyn przyporządkowano do czterech wielogenowych rodzin; jedna spośród nich to właśnie matriksyny, czyli metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej. MMP są enzymami o budowie wielodomenowej, wymagają obecności jonów wapnia do katalizy i razem zdolne są do degradacji wszystkich białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (extracellular matrix). Do ich substratów należą przede wszystkim kolageny, ale również wiele innych białek ECM, m.in. fibronektyny, lamininy, tenascyny, agrekany i osteonektyny [57]. Przyjmując za podstawę zarówno swoistość substratów, jak i strukturę domen oraz homologię sekwencyjną, MMP zazwyczaj przyporządkowuje się do czterech grup obejmujących: kolagenazy, stromelizyny, żelatynazy



Ryc.1. Budowa domenowa reprezentantów metaloproteinaz macierzy

(kolagenazy typu IV) i metaloproteinazy typu błonowego. Większość reprezentantów rodziny MMP jest zorganizowana w trzy główne, odrębne i stosunkowo konserwatywne domeny: N-końcowy propeptyd (prodomenę), domenę katalityczną i domenę hemopeksynową na karboksylowym końcu cząsteczki. U wielu MMP (dobrym przykładem są tu kolagenazy typu IV) obserwuje się inkorporację pewnych strukturalnych i funkcjonalnych modułów. Na przykład w domenę katalityczną kolagenaz typu IV, reprezentowanych przez MMP-2 i MMP-9 są włączone trzy tandemowe powtórzenia, homologiczne z domeną wiążącą kolagen fibronektynu typu II, które uczestniczą w wiązaniu zdenaturowanego kolagenu (żelatyny), lamininy i kolagenu typu IV [63]. Ponadto w MMP-9 można odnaleźć dodatkowy insert - bogatą w prolinę 54-aminokwasową sekwencję wykazującą dużą homologię z łańcuchem α₂ kolagenu typu V i charakteryzującą się wysokim stopniem glikozylacji. Domenową budowę kilku reprezentantów rodziny MMP przedstawiono na ryc. 1.

MMP uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, związanych z przebudową ECM, takich jak implantacja trofoblastu, embriogeneza, inwolucja organów reprodukcyjnych, gojenie ran [47,50,53,64]. Należy jednak podkreślić, że białka ECM nie stanowią jedynie elementów strukturalnych. Za ich pośrednictwem komórka może odbierać sygnały z otoczenia. Białka ECM pełnią bowiem również funkcję ligandów integryn – komórkowych receptorów adhezyjnych [11], a ponadto wiążą wiele makromolekuł sygnalnych, takich jak czynniki wzrostu [31]. W istocie białka ECM uczestniczą również w przekazywaniu sygnałów stymulujących proliferację, różnicowanie czy też wejście komórki w stan apoptozy. Wynika z tego, że MMP – dzięki zdolności do zmiany składu i strukturalnej organizacji ECM – są pośrednio zaangażowane we wszystkie te procesy. Oczywiście przebudowa i obrót metaboliczny białek ECM musi się znajdować pod ścisłą kontrolą, dlatego też aktywność MMP jest precyzyjnie regulowana na wielu poziomach, obejmujących zarówno transkrypcję genów, jak i zdarzenia potranskrypcyjne (stabilizacja mRNA, sekrecja, aktywacja proenzymów, hamowanie aktywności przez na-

turalne inhibitory – TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) oraz proteoliza [17,32,34,39,68].

Od dość dawna wiadomo, że MMP uczestniczą w przebudowie ECM, mniej natomiast znanym jest fakt, że ta grupa enzymów (zwłaszcza MMP-2 i MMP-9) rozpoznaje również wiele białek niebędących składnikami macierzy pozakomórkowej. Lista ich potencjalnych substratów spoza ECM jest już dość długa; można na niej odnaleźć wiele hormonów, receptorów, cytokin, chemokin i czynników wzrostu. Okazało się, że ważne biologicznie aktywne związki w wyniku proteolizy z udziałem MMP mogą być aktywowane, inaktywowane bądź przekształcane w produkty o zupełnie nowej aktywności biologicznej. O tych niezwykłych zdolnościach MMP pisaliśmy niedawno na łamach *Postępów Biochemii* [19]. Warto wspomnieć, że MMP odgrywają również istotną rolę w układzie immunologicznym, a zatem funkcja tych enzymów jest niezwykle złożona i nie sprowadza się do prostej przebudowy struktury macierzy pozakomórkowej. W świetle powyższych faktów zrozumiałe jest, że zarówno zmiany poziomu ekspresji MMP, jak i zachwianie równowagi między tymi enzymami a ich inhibitorami (TIMP), mogą prowadzić do rozwoju różnych stanów patologicznych. Bardzo dobrze udokumentowano udział MMP w patogenezie chorób nowotworowych, sercowo-naczyniowych, nadciśnieniu, ostrych i przewlekłych chorobach układu oddechowego oraz chorobach o podłożu autoimmunologicznym (reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane) został już dobrze udokumentowany [4,19,36,43,50,51].

3. ROLA KOLAGENAZ TYPU IV W PATOGENIEZIE CUKRZYCY

Wyniki badań ostatnich lat wskazują, że ta grupa enzymów uczestniczy również w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym, takich jak cukrzyca typu 1, a także cukrzyca typu 2. Zainicjowanie, progresja i rozwój cukrzycy typu 1 i jej powikłań są związane z zaburzeniem regulacji odporności humoralnej i komórkowej. Wyznacznikiem tego procesu jest chroniczna infiltracja wysp trzustkowych komórkami jednojądrzastymi, a makrofagi uważane są za

główną przyczynę aktywacji cytotoksycznych limfocytów T w obrębie komórek β wysp trzustkowych [69].

Descamps i wsp. [8] wykazali, że zarówno ostrym jak i przewlekłym stanem zapalnym trzustki towarzyszy wzrost ekspresji MMP-9. Wiadomo również, że przewlekłe stany zapalne trzustki mogą prowadzić do zaburzeń cukrzycowych. Około 60% chorych z chronicznym zapaleniem trzustki cierpi na cukrzycę, a w tej grupie u 30% pacjentów diagnozuje się cukrzycę typu 1 [7].

Mediatory stanu zapalnego, takie jak: interleukina 1 β (IL-1 β ; interleukin-1 β), czynnik martwicy nowotworu (TNF- α ; tumor necrosis factor α) i czynnik aktywacji płytek krwi (PAF; platelet-activating factor) mają zdolność aktywacji granulocytów obojętnochłonnych, co prowadzi do zaostrzenia procesu zapalnego. W dojrzałych granulocytach MMP-9 zgromadzona jest w ziarnistościach swoistych i żelatynazowych (trzciorzędowych) [46], a podczas ich aktywacji (degranulacja) dochodzi do wydzielenia tych ziarnistości poza komórkę. Uwolnienie MMP-9 w wyniku degranulacji jest procesem bardzo szybkim, trwającym niespełna godzinę od chwili stymulacji, a więc dziesięciokrotnie szybszym od syntezy enzymu *de novo* w innych komórkach obronnych. Zatem granulocyty dysponują potężnym potencjałem proteolitycznym, łatwym do szybkiej mobilizacji, a czynniki powodujące degranulację będą jednocześnie stymulowały sekrecję MMP-9. Enzym ten pośrednio wpływa na proces zapalny, może bowiem działać jako regulator, a jednocześnie efektor stanu zapalnego. Wiadomo, że niezwykle skutecznym chemoatraktantem w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych, a także monocytów jest jedna z chemokin CXC – interleukina 8 (interleukin-8; IL-8) [62]. Mniej natomiast znanym jest fakt, że IL-8 może stanowić substrat dla MMP-9. Co ciekawe, odcięcie sześciu aminokwasów z N-końca cząsteczki wyraźnie zwiększa aktywność tej chemokiny; skrócona IL-8 (7-77) wykazuje aż 10–20-krotnie większą aktywność od cząsteczki o pełnej długości, co może znacząco przyspieszać napływ granulocytów i monocytów do ognisk zapalnych. Z kolei IL-8 promuje degranulację neutrofilów, prowadząc do uwolnienia MMP-9 [8].

Aktywacja układu immunologicznego towarzysząca otyłości jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2. Infiltrację makrofagów w obszarze wysp trzustkowych obserwowano zarówno u chorych z cukrzycą typu 2, jak i u myszy (szczep C57BL/6J) utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej oraz u szczurów GK [10] (szczury GK są wygodnym zwierzęcym modelem cukrzycy). Już u jednomiesięcznych zwierząt poziom glukozy w osoczu jest wysoki (9 mM), a ponadto w odpowiedzi na obciążenie glukozą wydzielają znacznie mniej insuliny niż często wykorzystywane w badaniach szczury Wistar. U dwumiesięcznych zwierząt GK nie obserwuje się wydzielania insuliny przy stężeniu glukozy poniżej 16 mM [49]). Co więcej, zarówno komórki wysp trzustkowych pobrane od takich zwierząt, jak i pochodzące od chorych z cukrzycą typu 2 w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy w środowisku (11,2/33 mM) uwalniały do medium znaczne ilości czynników prozapalnych, w tym: IL-8, IL-6, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytarnych (G-CSF; granulocyte colony-stimulating factor), makrofagalnych protein zapalnych 1 α (MIP-1 α ; macrophage inflammatory

protein 1 alpha) oraz chemokiny KC (mysi homolog GRO α) (komórki gryzoni nie wytwarzają IL-8; funkcjonalnym homologiem IL-8 jest chemokina KC) [10]. Prawdopodobnie decydujące znaczenie dla migracji granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów i kolonizacji trzustki należy przypisać IL-8 (wytwarzanej u chorych z cukrzycą typu 2 w komórkach α trzustki), skoro ich wędrówka mogła być zablokowana przez przeciwciała neutralizujące tę cytokinę [10]. Migracja komórek zapalnych w kierunku chemoatycznego bodźca wymaga oczywiście ich współpracy z MMP, szczególnie kolagenazami typu IV, zdolnymi do degradacji ECM oraz jej wyspecjalizowanej postaci, jaką są błony podstawne naczyń krwionośnych.

Godnym odnotowania jest również to, że u chorych na cukrzycę typu 2 stężenie IL-8 w krążeniu jest wyraźnie podwyższone [9], a zwiększoną ekspresję tej cytokiny obserwowano także w adipocytach otyłych pacjentów z insulinooopornością [52]. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują, że w cukrzycy typu 2 dochodzi do aktywacji czynników prozapalnych a następstwem jest infiltracja makrofagów w obrębie wysp trzustkowych. Z kolei w makrofagach, za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- κ B, może dojść do wzrostu ekspresji licznych mediatorów zapalenia, takich jak TNF- α , IL-8, leukotrien B4 i wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS; reactive oxygen species), a w konsekwencji pobudzenia syntezy MMP, szczególnie MMP-9, zdolnej do degradacji ECM.

Towarzyszący cukrzycy stan zapalny trzustki, może prowadzić do wewnątrznarządowej aktywacji trypsynogenu. W tych warunkach, zaktywowana przez trypsynę MMP-9 [42] pochodząca z komórek zapalnych, degradując insulinę, przyczynia się do rozwoju hiperglikemii [7,8]. Wyniki badań opublikowane przez Descampa i wsp. [8] wskazują, iż MMP-9 może rozcinać insulinę na mniejsze fragmenty, a zatem brać udział w generowaniu immunodominujących epitopów insuliny, prowadząc tym samym do zaostrzenia przebiegu choroby [7,8]. Fragmenty łańcucha γ insuliny liczące 9–23 reszt aminokwasowych, mogą być prezentowane jako antygeny przez główny kompleks zgodności tkankowej (MHC-II; major histocompatibility complex class II). Pozostałe fragmenty o długości 1–23 aminokwasów, jeśli pozostają dłużej w środowisku zewnątrzkomórkowym, są podatne na dalszą degradację przez MMP-9. W konsekwencji ludzka insulina jest całkowicie niszczone przez ten enzym. W tym kontekście jest godnym odnotowania, że przeciwzapalne działanie insuliny, deficytowego hormonu w cukrzycy typu 1, można przynajmniej częściowo wyjaśnić jego zdolnością do hamowania syntezy MMP-9 [66].

Stwierdzono, że syntetyczne inhibitory MMP są zdolne do hamowania procesu degradacji insuliny i ich stosowanie może w niektórych przypadkach wspomagać terapię insulinową [8]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że wiele inhibitorów MMP, takich które już przeszły próby kliniczne wywołuje wiele działań niepożądanych, m.in. bóle mięśni i stawów [20]. Z naszych badań wynika, że związki polifenolowe (katechiny) wyizolowane z materiału roślinnego (pigwowiec japoński, wiesiołek dziwny), a także galusan epigalokatechiny (EGCG) pochodzący z zielonej herbaty, *in vivo*, w sposób zależny od dawki hamują aktywność MMP-2 i MMP-9 [58]. Również ekspresja tych

enzymów może być zahamowana przez wiele związków pochodzenia roślinnego, jak choćby likopen, resweratrol, czy też polifenolowe składniki ekstraktu granatowca [1,24,33], a zatem jest to kolejny powód, dla którego należy zachęcać pacjentów do spożywania jak największej ilości warzyw i owoców, oczywiście tych o niskim indeksie glikemicznym.

Dodatkowym potwierdzeniem, że MMP – w tym przede wszystkim kolagenazy typu IV – mogą być włączone w patogenezę cukrzycy jest też to, że ich stężenie mierzone w osoczu otrzymanym od chorych jest zdecydowanie wyższe niż w grupie kontrolnej, aczkolwiek trzeba przyznać, że istnieje wiele rozbieżności między wynikami uzyskanymi przez różne zespoły. Zbadawszy 201 chorych na cukrzycę Shiau i wsp. [56] stwierdzili, że stężenie obu kolagenaz typu IV jest wyższe niż w grupie kontrolnej – MMP-2 o ponad 82%, a MMP-9 o prawie 300%. Należy również podkreślić, że obserwowany przez nich znaczący wzrost stężenia tych enzymów w krążeniu nie był związany z rozwojem powikłań cukrzycowych, ponieważ włączyli do badań grupę pacjentów, u których prawdopodobnie nie doszło jeszcze do ich rozwoju (czas trwania choroby $4,5 \pm 0,2$ lat) [56]. Z kolei eksperymenty przeprowadzone wcześniej przez Maxwella i wsp. [38] nie wskazywały na wzrost stężenia MMP-2 w osoczu u chorych z cukrzycą typu 1, podczas gdy w odniesieniu do MMP-9 oba zespoły uzyskały podobne wyniki. Gdyby nie to, że Maxwell i wsp. [38] przebadali zaledwie 15 chorych, skłonni byłibyśmy przyjąć – i to z dwu powodów – że to właśnie oni się nie mylą. Po pierwsze, taki pogląd wynika z naszych wcześniejszych doświadczeń. Obserwowaliśmy kilkakrotny wzrost aktywności MMP-9 w krążeniu u chorych z rakiem płuca, podczas gdy aktywność MMP-2 była na poziomie grupy kontrolnej [22], mimo iż w ognisku nowotworowym aktywność tego enzymu była wielokrotnie wyższa niż w niezmięnionej nowotworowo parenchymie płuc [21]. Porównując chorych na gruźlicę z grupą kontrolną również obserwowaliśmy ponad trzykrotny wzrost aktywności MMP-9 w krążeniu, ale nie towarzyszył mu wzrost aktywności MMP-2 [23]. Podobne wyniki uzyskaliśmy także badając chorych z zapaleniem płuc oraz podczas eksperymentalnie wywołanej posocznicy u szczurów. Wzrostowi aktywności MMP-9 w osoczu nie towarzyszył wzrost aktywności MMP-2. We wszystkich tych przypadkach, podobnie jak w cukrzycy występuje zależna od MMP degradacja ECM i błon podstawnych, umożliwiającą wynaczynienie i wędrowkę leukocytów do ognisk nowotworowych/zapalnych. Po drugie, od dawna wiadomo, że MMP-9 jest typowym enzymem indukcyjnym wytwarzanym przede wszystkim przez leukocyty w odpowiedzi na mediatory zapalenia, podczas gdy MMP-2 przeważnie jest syntetyzowana konstytutywnie, głównie przez fibroblasty i komórki śródbłonna, co oczywiście nie oznacza, że w określonych warunkach nie może dojść do wzrostu ekspresji tego enzymu, czego przykładem jest choćby guz nowotworowy. Na ogół jednak zmiany aktywności tego enzymu w tkankach nie pociągają za sobą zmian aktywności w krążeniu.

Na powiązanie MMP-9 z przebiegiem cukrzycy typu 1 wskazuje również to, że ekspresja tego enzymu jest znacznie wyższa w leukocytach wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od chorych niż w grupie kontrolnej (zarówno w komórkach jednojądrzastych, jak i w granulocytach

obojętnochłonnych) [66]. Różnice widoczne były zarówno na poziomie mRNA (RT PCR), jak i na poziomie białka (ELISA, analiza zymograficzna). Wprawdzie u chorych na cukrzycę typu 1 obserwowano jednoczesny wzrost ekspresji TIMP-1 w granulocytach obojętnochłonnych i monocytach (ale nie w pozostałych komórkach jednojądrzastych), tym niemniej stosunek MMP-9/TIMP 1 był zdecydowanie wyższy u chorych niż w grupie kontrolnej. Podobne wyniki uzyskano analizując zwierzęcy model cukrzycy typu 1 (myszy NOD, u których spontanicznie rozwija się autoimmunologiczna postać cukrzycy przypominająca ludzką cukrzycę typu 1) [66].

4. ROLA MMP-2 I MMP-9 W ROZWOJU RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

Jak już wcześniej wspomniano, u chorych na cukrzycę, ze względu na przewlekły przebieg choroby, dochodzi do rozwoju wielu powikłań. Jednym z najważniejszych, mającym charakter mikroangiopatii, jest retinopatia cukrzycowa. Po dziesięcioletnim przebiegu choroby u większości pacjentów z cukrzycą typu 1 oraz u ponad 60% chorych na cukrzycę typu 2 można stwierdzić retinopatię. Zmiany patologiczne w retinopatii cukrzycowej są podobne w obu typach cukrzycy, chociaż stopień uszkodzenia oka jest większy w typie 1 cukrzycy. Jednak z powodu rzadszego występowania cukrzycy typu 1, wśród pacjentów tracących wzrok przeważają chorzy na cukrzycę typu 2 [59]. Retinopatia ulega progresji od etapu łagodnych nieproliferacyjnych zmian, poprzez stadium umiarkowanej (makulopatia) do nasilonej retinopatii proliferacyjnej. W najbardziej zaawansowanym etapie choroby mamy do czynienia z rozrostem nowych naczyń krwionośnych w obszarze siatkówki i tylnej powierzchni ciała szklonego [12]. Przerwanie wewnętrznej bariery krwi-siatkówka jest opisywane jako jedna z najwcześniejszych zmian obserwowanych w przebiegu retinopatii cukrzycowej. Bezpośrednim skutkiem uszkodzenia naczyń krwionośnych jest więc ich zwiększona przepuszczalność [14]. Cukrzycowe uszkodzenie naczyń krwionośnych w obrębie siatkówki jest następstwem wielu wcześniejszych zmian w tkance oka, dla których punktem wyjścia jest długotrwałe, podwyższone stężenie glukozy we krwi. Długotrwała hiperglikemia prowadzi m.in. do powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs; advanced glycation end products), które powodują wzrost wytwarzania ROS. Destrukcyjne działanie ROS na wiele komponentów komórkowych, w tym na DNA, zostało udokumentowane w badaniach prowadzonych na komórkach wyizolowanych od osób z cukrzycą [14,60]. AGEs przyczyniają się do nasilania stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonna naczyń, m.in. poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami komórkowymi makrofagów [28].

Długotrwała hiperglikemia prowadzi do aktywacji kaskady diacyloglicerol-kinaza C, co powoduje zmiany strukturalne w obrębie perycytów i ostatecznie stopniowy zanik tych komórek. Zmniejsza się kurczliwość mikrośródniczek siatkówki przy jednoczesnym zwiększeniu liczby komórek śródbłonna; dochodzi więc do zamknięcia światła drobnych naczyń krwionośnych z wytworzeniem obszarów hipoperfuzji [28].

Od dawna wiadomo, że jedną z głównych funkcji MMP-2 i MMP-9 jest regulacja angiogenezy, wieloetapowego

procesu obejmującego aktywację i rozplam komórek śródbłonna naczyń. Rolę MMP w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych w przebiegu retinopatii cukrzycowej można rozpatrywać na kilku płaszczyznach. Warunkiem zajścia angiogenezy jest m.in. zależna od MMP degradacja błony podstawnej, zbudowanej głównie z kolagenu typu IV oraz degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej, umożliwiająca inwazję proliferujących komórek na otaczające tkanki. Kolagenazy typu IV mogą stymulować angiogenezę jeszcze w inny sposób, degradując białka hamujące ten proces. Jednym z nich jest czynnik wywodzący się z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF; pigment epithelium derived factor), glikoproteina o masie cząsteczkowej 50 kDa, będąca głównym antyangiogenym czynnikiem oka. Należy jednak podkreślić, że MMP-2 i MMP-9 mogą się także przyczyniać do powstawania inhibitorów angiogenezy. Degradacja plazminogenu przez kolagenazy typu IV prowadzi bowiem do powstania angiostatyny, hamującej podziały i migrację komórek śródbłonna. W rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej mogą uczestniczyć obie kolagenazy typu IV, a wzrost ich ekspresji (lub aktywności) może być pochodną zwiększenia ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF; vascular endothelial growth factor) w niedokrwionych obszarach siatkówki, powstawania końcowych produktów nieenzymatycznej glikacji oraz wytwarzania ROS [14,40]. W indukowaniu neowaskularyzacji siatkówki uczestniczy wiele czynników wzrostu i cytokin, ale jednym z ważniejszych jest VEGF, którego ekspresja może być stymulowana przez hipoksję oraz ROS [7,8]. Czynnikiem zdolnym do hamowania angiogenezy indukowanej przez VEGF jest PEDF. Najwyższe stężenie tego inhibitora angiogenezy odnotowano w siatkówce, rogówce i ciele szklistym oka. Białko to poza przeciwdziałaniem neowaskularyzacji w obrębie siatkówki i naczyniówki, działa hamująco na unaczynianie i wzrost guzów, stymuluje różnicowanie neuronów oraz wykazuje działanie neuroprotektyjne [2,27,41]. Warto jednak zaznaczyć, że PEDF nie prowadzi do niszczenia już istniejących naczyń, a wręcz wykazuje w stosunku do nich działanie ochronne [65]. PEDF może hamować proces angiogenezy indukowanej przez VEGF. Aktywując γ -sekreazy prowadzi pośrednio do proteolitycznego cięcia w obrębie VEGFR-1; odcięta zostaje C-końcowa domena receptora, która następnie przemieszcza się z błony komórkowej do cytosolu [5]. Angiogeneza jest kontrolowana przez czynniki o charakterze stymulatorów i inhibitorów procesu tworzenia i rozwoju nowych naczyń krwionośnych, tak więc równoległe funkcjonowanie PEDF, MMP-2 i MMP-9 moduluje neowaskularyzację [2]. Notari i wsp. [41] wykazali, że hipoksja lub egzogennie podany VEGF mogą prowokować degradację PEDF przez MMP. Proteoliza PEDF w obrębie aminokwasów zajmujących pozycje 78–121 w łańcuchu polipeptydowym prowadzi do powstania produktów, które utraciły zdolność przeciwdziałania neowaskularyzacji i właściwości neurotrofowe [3]. Hamowanie degradacji PEDF przez MMP-2 i MMP-9 mogłoby być korzystne w leczeniu chorób oczu, z którymi związane jest wzmoczone tworzenie nowych naczyń krwionośnych i śmierć komórek siatkówki. Do schorzeń oczu, z których rozwojem związana jest nadekspresja kolagenaz typu IV oraz naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna można zaliczyć oprócz retinopatii cukrzycowej, także jaskrę, czy związaną z wiekiem degenerację plamki żółtej [41,65].

Degradacja składników ECM wydaje się ważnym elementem w rozwoju zaburzeń naczyniowych charakterystycznych dla retinopatii cukrzycowej i o ile udział MMP-2 i MMP-9 w jej rozwoju jest dość dobrze udokumentowany, jak dotąd niewiele wiadomo na temat obecności innych enzymów z rodziny MMP w tkankach oka, a zwłaszcza w ciele szklistym i siatkówce chorych na cukrzycę. Noda i wsp. [40] badali obecność kilku wybranych metaloproteinaz: MMP-2, -9, -1, -3, -7, -8 i -13 w ciele szklistym. Wyniki wykazały jednoznacznie, iż u chorych z retinopatią cukrzycową jedynie aktywność kolagenaz typu IV była znacząco wyższa niż w grupie kontrolnej. Stężenie MMP w ciele szklistym u osób zdrowych jest skrajnie niskie. Sugerowało to, że wzrost poziomu MMP-2 i MMP-9 obserwowany u chorych z retinopatią może być bezpośrednim skutkiem „przeciekania” składników osocza do tkanek oka. Jednak w stosunku do innych MMP nie stwierdzono żadnych znaczących różnic porównując ich ilość w ciałach szklistych chorych na cukrzycę i w grupie kontrolnej. Stwierdzono też, że ciało szkliste nie jest miejscem aktywacji kolagenaz typu IV; do tego procesu dochodzi we włóknistonych tkankach oka [40,54].

Głównym aktywatorem proMMP-2 w patologicznie zmienionych tkankach oka jest metaloproteinaza 1 typu błonowego (MT1-MMP; membrane type matrix metalloproteinase). Niezbędnym do aktywacji proMMP-2 przez MT1-MMP jest również tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy 2 (TIMP-2; tissue inhibitor of metalloproteinase-2), który działa jako białko łącznikowe w formowaniu trójskładnikowego kompleksu proMMP-2/TIMP-2/MT1-MMP. Noda i wsp. [40] wykazali, iż w porównaniu z MMP-2, stopień aktywacji proMMP-9 w obszarze włóknistonych naczyń tkanek oka jest znacznie niższy. Zarówno MMP-2 jak i MMP-9 są zdolne do degradacji kolagenu typu IV, żelatyny (zdenaturowany kolagen typu I), lamininy, fibronektyny i proteoglikanów. Noda i wsp. w swych badaniach dowiedli, że aktywność MMP-2 w tkankach naczyniowo-włóknistych oka prowadzi do degradacji składników błony podstawnej naczyń siatkówki. Natomiast MT1-MMP – główny aktywator proMMP-2 – zdolna jest do degradacji fibryny, której obecność wskazuje na uszkodzenia naczyń krwionośnych [40].

Na udział MMP-9 w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych może wskazywać to, że poziom tego enzymu jest znacząco wyższy u chorych na cukrzycę i co ważne, dodatnio skorelowany z progresją choroby, mimo że większość cząsteczek MMP-9 występuje w ciele szklistym w postaci latentnej. Według najnowszych doniesień [26,55] u chorych na cukrzycę poziom nieaktywnej postaci MMP-2 w ciele szklistym nie odbiega od wartości charakteryzujących grupę kontrolną. Natomiast obserwowano zwiększone stężenie MMP-9 cieczy szklistej pochodzącej od pacjentów z retinopatią proliferacyjną [26].

Nasze badania również wskazują, że obie kolagenazy typu IV, a zwłaszcza MMP-2 mogą mieć związek z rozwojem retinopatii cukrzycowej. Wykazaliśmy bowiem, że w cieczy wodnistej pobranej od chorych na cukrzycę, aktywność MMP-2 jest znacznie wyższa (2,6-krotnie) w grupie z retinopatią proliferacyjną i makulopatią niż u chorych bez takich powikłań, a ponadto aktywność tego enzymu była skorelowana z czasem trwania choroby. Jednocześnie

obecność MMP-9 w cieczy wodnistej odnotowaliśmy jedynie w kilku przypadkach, i tylko u chorych z retinopatią proliferacyjną [29].

Niezwykle interesujące są również wyniki badań przeprowadzonych przez kilka niezależnych grup eksperymentatorów na zwierzęcym modelu retinopatii. Podwyższoną aktywność MMP-2 i MMP-9 obserwowano u myszy, u których wcześniej zaindukowano retinopatię proliferacyjną; co więcej, podanie zwierzętom dootrzewnowo inhibitorów metaloproteinaz w znaczący sposób hamowało postęp neowaskularyzacji w siatkówce [37]. Z kolei u transgenicznych myszy, niemających genu MMP-2, u których wywołano retinopatię, proces angiogenezy był zdecydowanie spowolniony, co może dowodzić bezpośredniego udziału MMP-2 w patologicznym unaczynieniu siatkówki [44].

Udział MMP w procesie angiogenezy nowotworów znacznie lepiej udokumentowano niż podczas unaczynienia siatkówki [13]. Tym niemniej często się zakłada, że mechanizm patologicznej angiogenezy jest identyczny, niezależnie od kontekstu. Ale tak nie jest. Wyniki badań wskazują, na różnice między angiogenezą zachodzącą w siatkówce i w innych tkankach [6]. Na przykład, TIMP-1 hamuje powstawanie nowych naczyń w wielu tkankach, w tym nowotworowych, ale stymuluje angiogenezę w siatkówce [67]. Podobnie, mimo że MMP-9 uczestniczy w procesie angiogenezy nowotworów [30], w unaczynieniu siatkówki decydujące znaczenie prawdopodobnie należy jednak przypisać MMP-2 [44].

W tym kontekście jest niezwykle interesujące, że IL-8 może w sposób autokryny pobudzać ekspresję MMP-2, migrację komórek śródbłonna izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC; human vein umbilical endothelial cell) i tworzenie nowych naczyń [35]. Wprawdzie nie wiadomo, czy taki mechanizm funkcjonuje również w obszarze siatkówki, ale jest to wielce prawdopodobne; u chorych z retinopatią proliferacyjną, w porównaniu z grupą kontrolną, obserwowano bowiem zwiększone stężenie tej cytokiny w ciecie szklistym [48].

Mimo że znane są wyniki badań wskazujących na wzrost stężenia MMP-9 w krążeniu u chorych z retinopatią cukrzycową [25], nie przypisywalibyśmy takim analizom znaczenia prognostycznego. Z naszych wcześniejszych doświadczeń wynika, że poziom/aktywność tego enzymu w osoczu wzrasta również w chorobach o podłożu zapalnym oraz w chorobach nowotworowych. Byłby to zatem marker bardzo nieswoisty. Golubnitschaja wraz z zespołem [16] dowiodła natomiast, że jednoczesne oznaczanie ekspresji *MMP-2*, *MMP-9* i *rekoweryny* w komórkach jednojądrzastych może mieć wartość prognostyczną, ponieważ poziom transkrypcji tych trzech genów jest wyższy u chorych z retinopatią proliferacyjną niż u chorych na cukrzycę bez towarzyszącego patologicznego unaczynienia siatkówki.

5. PODSUMOWANIE

U chorych na cukrzycę istnieje duże ryzyko pogorszenia jakości życia oraz zwiększonej śmiertelności. Przyczyną są rozwijające się powikłania o charakterze naczyńiowym, wszystkie bowiem postaci kliniczne cukrzycy powodują powstawanie złożonych, zwyrodnieniowych zmian w układach małych naczyń o średnicy mniejszej od 100 nm (mikroangiopatia) oraz w średnich i dużych tętnicach – makroangiopatia. Duża śmiertelność w populacji chorych na cukrzycę wynika właśnie ze współistnienia powikłań naczyńiowych [59]. Kolagenazy typu IV włączone są zarówno w angiogenezę cukrzycy, jak również w rozwój i progresję powikłań z nią związanych. U podłoża zmian naczyńiowych obserwowanych w przebiegu cukrzycy leży hiperglikemia. Natomiast wśród czynników nieodłącznie związanych z cukrzycą, które mogą powodować pośrednio wzrost ekspresji/aktywacji kolagenaz typu IV należy wymienić: wzrost stężenia LDL i zaawansowanych produktów glikacji oraz zwiększone wytwarzanie ROS. Metaloproteinazy poprzez zdolność do degradacji insuliny w sposób znaczący zaostwiają przebieg choroby, a zależna od MMP degradacja błon podstawnych, składników ECM i czynników o charakterze antagonistów angiogenezy jest warunkiem przebiegu procesu nowotworzenia naczyń, leżącego u podstaw rozwoju retinopatii cukrzycowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahmed S., Wang N., Hafeez B.B., Cheruvu V.K., Haqqi T.M.: Punica granatum L. extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes *in vitro*. *J. Nutr.*, 2005; 135: 2096–2102
- [2] Apte R.S., Barreiro R.A., Duh E., Volpert O., Ferguson T.A.: Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004; 45: 4491–4497
- [3] Aymerich M.S., Alberdi E.M., Martinez A., Becerra S.P.: Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42: 3287–3293
- [4] Bainbridge J., Sivakumar B., Paleolog E.: Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis: lessons from oncology. *Curr. Pharm. Des.*, 2006; 12: 2631–2644
- [5] Cai J., Jiang W.G., Grant M.B., Boulton M.: Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 3604–3613
- [6] Campochiaro P.A.: Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006; 47: 462–474
- [7] Descamps F.J., Martens E., Ballaux F., Geboes K., Opendakker G.: *In vivo* activation of gelatinase B/MMP-9 by trypsin in acute pancreatitis is a permissive factor in streptozotocin-induced diabetes. *J. Pathol.*, 2004; 204: 555–561
- [8] Descamps F.J., Van den Steen P.E., Martens E., Ballaux F., Geboes K., Opendakker G.: Gelatinase B is diabetogenic in acute and chronic pancreatitis by cleaving insulin. *FASEB J.*, 2003; 17: 887–889
- [9] Doganay S., Evereklioglu C., Er H., Türköz Y., Sevinç A., Mehmet N., Savli H.: Comparison of serum NO, TNF- α , IL-1 β , sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye*, 2002; 16: 163–170
- [10] Ehsn J.A., Perren A., Eppler E., Ribaux P., Pospisilik J.A., Maor-Cahn R., Gueripel X., Ellingsgaard H., Schneider M.K., Biollaz G., Fontana A., Reinecke M., Homo-Delarche F., Donath M.Y.: Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2007; 56: 2356–2370
- [11] Ffrench-Constant C., Colognato H.: Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol.*, 2004; 14: 678–686
- [12] Fong D.S., Aiello L., Gardner T.W., King G.L., Blankenship G., Cavallerano J.D., Ferris F.L. III, Klein R.: Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care.*, 2004; 27 (Suppl.1): S84–S87

- [13] Genís L., Gálvez B.G., Gonzalo P., Arroyo A.G.: MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev.*, 2006; 25: 77–86
- [14] Giebel S.J., Menicucci G., McGuire P.G., Das A.: Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab. Invest.*, 2005; 85: 597–607
- [15] Gillespie K.M.: Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*, 2006; 175: 165–170
- [16] Golubnitschaja O., Jaksche A., Moenkemann H., Yeghiazaryan K., Karl S.E., Trog D., Schild H.H., Löffler K.U.: Molecular imaging system for possible prediction of active retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Amino Acids*, 2005; 28: 229–237
- [17] Hahn-Dantona E., Ruiz J.F., Bornstein P., Strickland D.K.: The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 15498–15503
- [18] Hangai M., Kitaya N., Xu J., Chan C.K., Kim J.J., Werb Z., Ryan S.J., Brooks P.C.: Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 1429–1437
- [19] Hrabec E., Naduk J., Stręk M., Hrabec Z.: Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy zewnątrzkomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory. *Post. Biochem.*, 2007; 53: 37–45
- [20] Hrabec E., Stręk M., Hrabec Z.: Inhibitors of matrix metalloproteinases. *Curr. Pneumol.*, 2000; 4: 65–70
- [21] Hrabec E., Stręk M., Nowak D., Greger J., Suwalski M., Hrabec Z.: Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2002; 128: 197–204
- [22] Hrabec E., Stręk M., Nowak D., Hrabec Z.: Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer. *Respir. Med.*, 2001; 95: 1–4
- [23] Hrabec E., Stręk M., Zięba M., Kwiatkowska S., Hrabec Z.: Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2002; 6: 713–719
- [24] Huang C.S., Fan Y.E., Lin C.Y., Hu M.L.: Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1. *J. Nutr. Biochem.*, 2007; 18: 449–456
- [25] Jacqueminet S., Ben Abdesselam O., Chapman M.J., Nicolay N., Foglietti M.J., Grimaldi A., Beaudoux J.L.: Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 367: 103–107
- [26] Jin M., Kashiwagi K., Iizuka Y., Tanaka Y., Imai M., Tsukahara S.: Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina*, 2001; 21: 28–33
- [27] Karakousis P.C., John S.K., Behling K.C., Surace E.M., Smith J.E., Hendrickson A., Tang W.X., Bennett J., Milam A.H.: Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.*, 2001; 7: 154–163
- [28] Karnafel W.: Przewlekłe powikłania cukrzycy – patogeneza, implikacje kliniczne. *Przew. Lek.*, 2000; 9: 61–68
- [29] Kłysik A.B., Naduk J., Goś R., Komorowski J., Hrabec Z., Hrabec E.: Intraocular matrix metalloproteinase 2 and 9 in npatients with diabetes mellitus. *Eur. J. Ophthalmol.*, (w druku)
- [30] Kong D., Li Y., Wang Z., Banerjee S., Sarkar F.H.: Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.*, 2007; 67: 3310–3319
- [31] Kresse H., Schönherr E.: Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell Physiol.*, 2001; 189: 266–274
- [32] Lechapt-Zalzman E., Prulie're-Escabasse V., Advenier D., Galiacy S., Charriere-Bertrand C., Coste A., Harf A., d'Ortho M.P., Escudier E.: Transforming growth factor-β1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2006; 290: L1277–L1282
- [33] Lee B., Moon S.K.: Resveratrol inhibits TNF-α-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J. Nutr.*, 2005; 135: 2767–2773
- [34] Legrand C., Polette M., Tournier J.M., de Bentzmann S., Huet E., Monteau M., Birembaut P.: uPa/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp. Cell Res.*, 2001; 264: 326–336
- [35] Li A., Varney M.L., Valasek J., Godfrey M., Dave B.J., Singh R.K.: Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis*, 2005; 8: 63–71
- [36] Lindsey M.L.: MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail. Rev.*, 2004; 9: 7–19
- [37] Majka S., McGuire P., Colombo S., Das A.: The balance between proteinases and inhibitors in a murine model of proliferative retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42: 210–215
- [38] Maxwell P.R., Timms P.M., Chandran S., Gordon D.: Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet. Med.*, 2001; 18: 777–780
- [39] Nagase H., Brew K.: Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Soc. Symp.*, 2003; 70: 201–212
- [40] Noda K., Ishida S., Inoue M., Obata K., Oguchi Y., Okada Y., Ikeda E.: Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003; 44: 2163–2170
- [41] Notari L., Miller A., Martinez A., Amaral J., Ju M., Robinson G., Smith L.E., Becerra S.P.: Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005; 46: 2736–2747
- [42] Nyberg P., Moilanen M., Paju A., Sarin A., Stenman U.H., Sorsa T., Salo T.: MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances *in vivo* invasion of human tongue carcinoma cells. *J. Dent. Res.*, 2002; 81: 831–835
- [43] Ohbayashi H.: Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2002; 3: 409–421
- [44] Ohno-Matsui K., Uetama T., Yoshida T., Hayano M., Itoh T., Morita I., Mochizuki M.: Reduced retinal angiogenesis in MMP-2-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003; 44: 5370–5375
- [45] Okamoto A., Iwamoto Y., Maru Y.: Oxidative stress-responsive transcription factor ATF3 potentially mediates diabetic angiopathy. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 1087–1097
- [46] Opendakker G., Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Masure S., Proost P., Van Damme J.: Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.*, 2001; 69: 851–859
- [47] Ortega N., Behonick D., Stickers D., Werb Z.: How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 995: 109–116
- [48] Petrovic M.G., Korosec P., Kosnik M., Hawlina M.: Vitreous levels of interleukin-8 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 2007; 143: 175–176
- [49] Portha B., Serradas P., Bailbe D., Suzuki K., Goto Y., Giroix M.H.: Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes*, 1991; 40: 486–491
- [50] Przybyłowska K., Błasiak J.: Metaloproteazy macierzowe i ich rola w progresji nowotworów. *Post. Biochem.*, 2001; 47: 212–223
- [51] Rosenberg G.A.: Matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: is it time for a treatment trial? *Ann. Neurol.*, 2001; 50: 431–433
- [52] Rotter V., Nagaev I., Smith U.: Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-α, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 45777–45784
- [53] Salmela M.T., Pender S.L., Karjalainen-Lindsberg M.L., Puolakkainen P., Macdonald T.T., Saarialho-Kere U.: Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004; 39: 1095–1104
- [54] Salzmann J., Limb G.A., Khaw P.T., Gregor Z.J., Webster L., Chignell A.H., Charteris D.G.: Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 2000; 84: 1091–1096
- [55] Sethi C.S., Bailey T.A., Luthert P.J., Chong N.H.: Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br. J. Ophthalmol.*, 2000; 84: 654–666
- [56] Shiau M.Y., Tsai S.T., Tsai K.J., Haung M.L., Hsu Y.T., Chang Y.H.: Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt. Sinai J. Med.*, 2006; 73: 1024–1028
- [57] Stamenkovic I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.*, 2003; 200: 448–464

- [58] Streck M., Górlach S., Podsedek A., Sosnowska D., Koziołkiewicz M., Hrabec Z., Hrabec E.: Procyanidin oligomers from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: 6447–6452
- [59] Szmít S., Opólski G.: Mikroangiopatia cukrzycowa – współczesne spojrzenie na patogenezę i znaczenie w chorobach układu sercowo-naczyniowego. *Przegląd Kardiologiczny*, 2006; 1: 27–34
- [60] Tayebjee M.H., Lim H.S., MacFadyen R.J., Lip G.Y.: Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes: effect of 1 year's cardiovascular risk reduction therapy. *Diabetes Care*, 2004; 27: 2049–2051
- [61] Tripathi B.K., Srivastava A.K.: Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med. Sci. Monit.*, 2006; 12: RA130–RA147
- [62] Van den Steen P.E., Proost P., Wuyts A., Van Damme J., Opdenakker G.: Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 2000; 96: 2673–2681
- [63] Visse R., Nagase H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, 2003; 92: 827–839
- [64] Vu T.H., Werb Z.: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.*, 2000; 14: 2123–2133
- [65] Wong W.T., Rex T.S., Auricchio A., Maguire A.M., Chung D., Tang W., Bennett J.: Effect of over-expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on developing retinal vasculature in the mouse. *Mol. Vis.*, 2004; 10: 837–844
- [66] Xue M., Thompson P.J., Clifton-Bligh R., Fulcher G., Gallery E.D., Jackson C.: Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005; 37: 2406–2416
- [67] Yamada E., Tobe T., Yamada H., Okamoto N., Zack D.J., Werb Z., Soloway P.D., Campochiaro P.A.: TIMP-1 promotes VEGF-induced neovascularization in the retina. *Histol. Histopathol.*, 2001; 16: 87–97
- [68] Yang Z., Strickland D.K., Bornstein P.: Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 8403–8408
- [69] Yoon J.W., Jun H.S.: Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2001; 928: 200–211