

Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) w surowicy chorych z polineuropatią alkoholową w odniesieniu do polineuropatii cukrzycowej

Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)
in alcoholic versus diabetic polyneuropathy

**Grażyna Michałowska-Wender^{1,2}, Grażyna Adamcewicz³
Mieczysław Wender¹**

1. Zespół Neuroimmunologiczny Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN, Poznań
2. Laboratorium Neurogenetyki Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego, Poznań
3. Szpital Wojewódzki dla Chorób Neurologicznych i Psychiatrycznych, Cibórz

Abstract – Introduction. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) belongs to the family of zinc-dependent endoproteases, implicated in several pathological processes. The contribution of MMP-9 to the mechanism of alcoholic and diabetic polyneuropathies is not known and requires explanation.

Methods. The expression of MMP-9 in serum was studied in 31 patients with chronic alcohol abuse, 29 with type 2 diabetes, and 20 healthy controls. The type of polyneuropathy (involvement of axon or myelin) was evaluated by electrophysiological methods (EMG and nerve conduction velocity). The MMP-9 level was determined with ELISA method. For statistical comparison of differences t-Student test and analysis of variances with “post-hoc” Duncan test were used. The evaluated material was divided according to clinical duration of polyneuropathy and electrophysiological pattern.

Results. The expression of MMP-9 in serum of patients with either type of polyneuropathy did not differ significantly from that seen in the control material. However, when both types of polyneuropathy were compared with themselves, the higher value of MMP-9 in alcohol polyneuropathy reached the level of statistical significance, but it would not justify to point out that overexpression of MMP-9 may be involved in the mechanism of nerve injury in this form of polyneuropathy.

Key words: MMP-9, alcoholic polyneuropathy, diabetic polyneuropathy

Streszczenie – Wstęp. Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) należy do rodziny endoproteinaz cynkowo-zależnych, powiązanych z wieloma procesami patologicznymi. Udział MMP-9 w mechanizmie alkoholowej i cukrzycowej polineuropatii nie jest znany i wymaga wyjaśnienia.

Metoda. Ekspresję MMP-9 w surowicy badano u 31 pacjentów przewlekle nadużywających alkoholu i u 29 z typem 2 cukrzycy oraz u 20 osób z grupy kontrolnej. Typ polineuropatii (uszkodzenie aksonalne czy mieliny) oceniano przy użyciu metod elektrofizjologicznych (EMG i szybkość przewodnictwa nerwowego). Poziom MMP-9 oceniano metodą ELISA. Dla statystycznej oceny różnic zastosowano test t-Studenta oraz analizy wariancji z testem *post-hoc* Duncana. Badany materiał podzielono według czasu trwania polineuropatii i obrazu elektrofizjologicznego.

Źródło finansowania pracy: środki własne uczelni.

Wyniki. Ekspresja MMP-9 w surowicy u pacjentów w obu typach polineuropatii nie różniła się istotnie od obserwowanej w materiale kontrolnym. Natomiast przy porównaniu obu typów polineuropatii, wyższe wartości MMP-9 w alkoholowej polineuropatii osiągnęły poziom statystycznej istotności. Na tej podstawie nie ma jednak danych do przyjęcia, że nadekspresja MMP-9 może być związana z mechanizmem uszkodzenia nerwów w tej postaci polineuropatii.

Słowa kluczowe: MMP-9, polineuropatia alkoholowa, polineuropatia cukrzycowa

WSTĘP

Metaloproteiny macierzy (substancji) zewnątrzkomórkowej – MMP należą do rodziny cynkowo-zależnych endoproteinaz, które są efektorami remodelowania zewnątrzkomórkowych składników tkanek w procesach patologicznych. W zależności od powinowactwa do różnych typów substratu składników macierzy zewnątrzkomórkowej dzielą się na kolagenazy (MMP-1, -8, -13), gelatinyzy (MMP-2, -9), stremelizyny (MMP-3, -10, -11), matrilizyny (MMP-7), metaloproteiny typu błonowego (MMP-14, -15, -16, -24) i metaloelastazy (MMP-12).

Gelatynaza MMP-9, łącznie z MMP-2 odgrywa istotną rolę w uszkodzeniu systemów barier krew–mózg i krew–nerw w takich chorobach zapalnych układu nerwowego, jak doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia – EAE i bakteryjne zapalenie opon (1). Dlatego też dużo uwagi poświęca się udziałowi metaloproteiny-9 w wielu procesach patologicznych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym.

Poziom MMP-9 w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy uważany jest za potencjalny wskaźnik aktywności choroby, wskazujący na utrzymywanie się procesu zapalnego u chorych ze stwardnieniem rozsianym (2). Ekspresja MMP-9 jest podwyższona w surowicy chorych ze stwardnieniem bocznym zanikowym (3). Ci ostatni autorzy – Demestre i wsp. – podkreślają, że aktywne MMP-9 w surowicy może pochodzić nie tylko z uszkodzonych mięśni czy nerwów, ale również z krążących komórek krwi. Krążąca MMP-9 wydaje się brać udział w zaburzeniach nerwów obwodowych w demielinizacyjnym zespole Guillain-Barré (4). Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi badaniami Kieseiera i wsp., którzy stwierdzili wzrost aktywności MMP-9 w nerwach kulszowych w doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniu nerwów u szczurów rasy Lewis oraz w zespole Guillain-Barré (5).

Jak stwierdziliśmy w naszych poprzednich badaniach (6), istnieją znaczne różnice w udziale niektórych cytokin w patomechanizmie alkoholowej i cukrzycowej polineuropatii. Ekspresja chemotaktycznego czynnika białkowego-1 (MCP-1) w surowicy była wyższa, na granicy istotności statystycznej w postaci demielinizacyjnej alkoholowej polineuropatii. Poziom czynnika stymulującego wzrost czerniaka (GRO- α) był wyższy u pacjentów z alkoholową polineuropatią i w postaci demielinizacyjnej neuropatii cukrzycowej.

Pomimo znaczenia MMP-9 w procesach patologicznych układu nerwowego, udział MMP-9 w mechanizmie polineuropatii alkoholowej i cukrzycowej nie jest znany i wymaga wyjaśnienia.

MATERIAŁ I METODA

Badana populacja polineuropatii obejmuje 31 osób z historią przewlekłego alkoholizmu oraz 29 z 2 typem cukrzycy. Grupa alkoholowej polineuropatii składa się z 8 kobiet i 23 mężczyzn. Średni wiek chorych wynosił 54,5 lat \pm 14,7 (zakres od 28 do 61 lat). Grupa polineuropatii cukrzycowej składała się z 8 kobiet i 21 mężczyzn. Średni wiek w tej grupie to 48,3 lat \pm 17,6 (zakres od 20 do 70 lat).

Tabela 1.

Ekspresja MMP-9 w surowicy pacjentów z polineuropatią alkoholową w pg/ml
Expression of MMP-9 in serum of patients with alcoholic polyneuropathy in pg/ml

Grupa kontrolna <i>Control</i>	Ogółem <i>Total</i>	Polineuropatia alkoholowa <i>Alcoholic polyneuropathy</i>			
		Typ <i>Type</i>		Czas trwania <i>Clinical duration</i>	
		Demielinizacyjny <i>Demyelinating</i>	Demielinizacyjno-aksonalny <i>Demyelinating axonal</i>	2–8 lat	\geq 10 lat
n = 20	n = 31	n = 12	n = 19	n = 12	n = 19
3,71	4,72	4,23	5,04	4,11	5,02
$\pm 2,28$	$\pm 2,76$	$\pm 2,39$	$\pm 2,99$	$\pm 2,16$	$\pm 3,01$
p = 0,106		p = 0,326		p = 0,430	
post-hoc Duncan test		t-test		t-test	

Średnia \pm SD, Mean \pm SD

p – różnice w stosunku do materiału kontrolnego, p – differences vs control material

Tabela 2.

Ekspresja MMP-9 w surowicy chorych z polineuropatią cukrzycową w pg/ml
Expression of MMP-9 in serum of patients with diabetic polyneuropathy in pg/ml

Grupa kontrolna <i>Control</i>	Ogółem <i>Total</i>	Polineuropatia cukrzycowa <i>Diabetic polyneuropathy</i>				
		Typ <i>Type</i>			Czas trwania <i>Clinical duration</i>	
		Demielinizacyjny <i>Demyelinating</i>	Aksonalny <i>Axonal</i>	Demielinizacyjno-aksonalny <i>Demyelinating axonal</i>	2–8 lat	\geq 9 lat
n = 20	n = 29	6	19	4	n = 12	n = 14
3,71	3,18	2,73	2,36	3,45	3,18	3,29
$\pm 2,28$	$\pm 1,55$	$\pm 1,46$	$\pm 0,65$	$\pm 1,67$	$\pm 1,71$	$\pm 1,48$
p = 0,494		p = 0,386			p = 0,730	
post-hoc Duncan test		ANOVA			t – test	

Średnia \pm SD, Mean \pm SD

p – różnice w stosunku do materiału kontrolnego, p – differences vs control material

W obrazie klinicznym polineuropatii alkoholowej i cukrzycowej dominowały objawy ruchowe (opadanie stóp i rąk), parestezje, osłabienie czucia powierzchniowego oraz ból w kończynach dolnych, rzadziej górnych. Badania elektrofizjologiczne wykazywały cechy uszkodzenia cienkich włókien ruchowych i grubych skórnych włókien czuciowych. Wczesne objawy wyrażały się obniżeniem amplitudy odpowiedzi czuciowych i ruchowych, przy prawidłowej lub minimalnie obniżonej szybkości przewodzenia. Dalsze zwolnienie szybkości przewodzenia występowało w miarę zmniejszania się amplitudy odpowiedzi i było oznaką wtórnego do aksonalnego uszkodzenia demielinizacyjnego.

Grupę polineuropatii alkoholowej podzielono na dwie podgrupy, jedną – z czasem trwania objawów krótszym niż 9 lat i drugą – z przebiegiem klinicznym dłuższym niż 10 lat. Grupa z polineuropatią cukrzycową została podzielona w zależności od przebiegu klinicznego na dwie podgrupy, jedną – z krótszym czasem trwania choroby (od 2 do 8 lat) i drugą – z objawami klinicznymi polineuropatii trwającymi dłużej niż 9 lat.

Grupa kontrolna składała się z 20 zdrowych osób (średnia wieku 49,1 lat \pm 16,8, zakres od 23 do 78 lat).

Poziom MMP-9 w surowicy krwi był określany dwukrotnie za pomocą testu ELISA, z zastosowaniem zestawu MMP-9 (Quantikine, system R&D, USA). Dla statystycznej oceny różnic pomiędzy grupami z polineuropatią i grupą kontrolną zastosowano test t-Studenta oraz analizę wariancji z testem *post-hoc* Duncana.

WYNIKI

Ekspresja MMP-9 w surowicy krwi chorych z polineuropatią alkoholową i cukrzycową nie różniła się istotnie od materiału kontrolnego. Szczegółowe wyniki przedstawiają tabele 1 i 2. Przy porównaniu obu typów polineuropatii, wyższy poziom MMP-9 w polineuropatii alkoholowej osiągnął poziom istotności statystycznej (tab. 3).

Tabela 3.
Ekspresja MMP-9 w surowicy chorych z polineuropatią alkoholową w porównaniu z cukrzycową w pg/ml
Expression of MMP-9 in serum of patients with alcoholic versus diabetic polyneuropathy in pg/ml

Grupa kontrolna <i>Control</i> n = 20	Polineuropatia cukrzycowa <i>Diabetic polyneuropathy</i> n = 29	Polineuropatia alkoholowa <i>Alcoholic polyneuropathy</i> n = 31
3,71 \pm 2,28	3,18 \pm 1,55	4,72 \pm 2,76
alkoholowa versus cukrzycowa <i>alcoholic versus diabetic</i>		p = 0,030 post-hoc Duncan test

OMÓWIENIE

Zewnątrzkomórkowe proteinazy są ważnymi regulatorami czynności tkanek w wielu zjawiskach życiowych, poczynając od morfogenezy i dojrzewania, a także w wielu procesach patologicznych zapalnych, zwyrodnieniowych i proliferacyjnych.

Zagadnienie udziału metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), w tym metaloproteinazy 9 (MMP-9), w mechanizmie uszkodzeń tkanki nerwowej, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* jest aktualnie przedmiotem dyskusji (7, 8, 9, 10). Przyjmuje się, że metaloproteinazy – łącznie z aktywnymi komórkami T szczególnie typu CD4 (pomocnicze) oraz CD8 – są mediatorami uszkodzeń neuronalnych, prowadzących z kolei do zwyrodnienia aksonów i demielinizacji. Szczególnie interesujące było stwierdzenie, że ostre uszkodzenie aksonalne w stwardnieniu rozsianym jest połączone ze wzrostem aktywności MMP-9 (9).

Ekspresja MMP-9 w cukrzycy jest przedmiotem wyraźnych kontrowersji. Na dużym materiale pacjentów z typem 2 cukrzycy Lee i wsp. nie stwierdzili różnic w ekspresji w całej badanej grupie, w porównaniu z materiałem kontrolnym, jak również w podgrupach podzielonych według wieku, czasu trwania cukrzycy, wysokości ciśnienia krwi i stężenia lipidów w surowicy (11). W przeciwieństwie do tych wyników, Derosa i wsp. na podstawie rozległych badań podali, że poziom MMP-9 był podwyższony u chorych z cukrzycą, co może wskazywać na nieprawidłową przemianę macierzy zewnątrzkomórkowej (12).

W naszych badaniach nie stwierdziliśmy wyższych wartości MMP-9 w alkoholowej i cukrzycowej polineuropatii w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Jest jedynie bardzo uderzająca istotnie wyższa ekspresja MMP-9 w alkoholowej polineuropatii w porównaniu z cukrzycową. Nie jest to jednak wystarczającym argumentem do udowodnienia tezy, że zwiększona ekspresja MMP-9 może być powiązana z mechanizmem uszkodzenia nerwów w tej postaci polineuropatii. Istnieją dane doświadczalne wskazujące na wpływ minocyklin na obniżenie aktywności MMP-9 (7). W pierwszych próbach klinicznych w stwardnieniu rozsianym próbowano zmniejszyć w ten sposób zwyrodnienie włókien nerwowych w mózgu. (13). Może to wskazywać, ale na razie tylko hipotetycznie, na możliwość użycia minocyklin dla zmniejszenia uszkodzeń nerwów w polineuropatii alkoholowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Renaud S, Erne B, Fuhr P, Said G, Lacroix C, Steck AJ, Leppert D (2003) Matrix metalloproteinases-9 and -2 in secondary vasculitic neuropathies. *Acta Neuropathologica*, 105, 37–42.
2. Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato MC, Baldi E, Casetta I, Paolino E, Granieri E, Dallochio F (2006) Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 12, 294–301.
3. Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH (2005) The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 159, 146–154.

4. Sharshar T, Durand MC, Lefaucheur JP, Lofaso F, Raphaël JC, Gherardi RK, Créange A (2002) MMP-9 correlates with electrophysiologic abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, 59, 1649–1651.
5. Kieseier BC, Clements JM, Pischel HB, Wells GM, Miller K, Gearing AJ, Hartung HP (1998) Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology*, 43, 427–434.
6. Michałowska-Wender G, Adamcewicz G, Wender M (2007) Impact of cytokines on the pathomechanism of diabetic and alcoholic neuropathies. *Folia Neuropathologica*, 45, 78–81.
7. Leppert D, Hughes P, Huber S, Erne B, Grygar C, Said G, Miller KM, Steck AJ, Probst A, Fuhr P (1999) Matrix proteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystematic vasculitic neuropathy. *Neurology*, 53, 62–70.
8. Yong VW, Giuliani F, Xue M, Bar-Or A, Metz LM (2007) Experimental models of neuroprotection relevant to multiple sclerosis. *Neurology*, 22, 33–37.
9. Yong VW (2005) Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Review Neuroscience*, 6, 931–944.
10. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Review Neuroscience*, 2, 502–511.
11. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, Nam MS, Lee KW (2005) Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 69, 175–179.
12. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AF (2007) Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes & Metabolism*, 33, 129–134.
13. Metz LM, Zhang Y, Yeung M, Patry DG, Bell RB, Stojan CA, Yong VW, Patten SB, Duquette P, Antel JP, Mitchell JR (2004) Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 55, 756.

Adres do korespondencji

Grażyna Michałowska-Wender
Katedra Neurologii Uniwersytetu Medycznego
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań
tel. (4861) 869 17 91
fax: (4861) 869 16 97
e-mail: grazynawender@wp.pl

otrzymano 20.11.07 r.

przyjęto do druku 14.02.08 r.