

Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry

The role of metalloproteinases and their inhibitors in the pathomechanism of skin diseases

BOŻENA DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK^{1/}, ELŻBIETA WASZCZYKOWSKA^{1/}, AGNIESZKA ŻEBROWSKA^{2/}

^{1/} Zakład Immunodermatologii Katedry Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Krzemieniecka 6, 94-015 Łódź

^{2/} Klinika Dermatologii i Wenerologii Katedry Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Krzemieniecka 5, 90-017 Łódź

Metaloproteinazy (*Metalloproteinases* – MMPs) stanowią rodzinę metalozależnych endopeptydaz degradujących macierz pozakomórkową. Uczestniczą w szeregu fizjologicznych i patologicznych procesów. Ich poziom wzrasta w chorobach związanych z zaburzeniami budowy i degradacji macierzy tkanki łącznej. Destrukcja tkanek w chorobach przebiegających ze zwiększonym poziomem MMPs często jest wynikiem zachwiania równowagi pomiędzy poziomem tych enzymów i ich inhibitorów. Ostatnio pojawiły się doniesienia o znaczącej roli metaloproteinaz w patogenezie kolagenoz, jak i chorób pęcherzowych. Prawdopodobnie odgrywają one znaczącą rolę w procesach tworzenia pęcherzy oraz zaburzeń procesu włóknienia.

Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 71-79

Słowa kluczowe: metaloproteinazy, tkankowe inhibitory metaloproteinaz, pemfigoid, opryszczkowe zapalenie skóry, twardzina

Matrix metalloproteinases (MMPs) are members of a large family of enzymes that can degrade extracellular matrix (ECM). They participate in a broad variety of normal and pathologic states and recent evidence implicates the MMP family as potential mediators of remodeling and degradation of extracellular matrix. The abnormal regulation of MMP and specific inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) expression may cause destruction of tissue in some diseases. There is some evidence that the activity of metalloproteinases is elevated in collagenosis and bullous diseases in which they play, perhaps, a crucial role in blisters formation or changes in fibrosing processes.

Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 71-79

Key words: metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, pemphigoid, dermatitis herpetiformis, scleroderma

Metaloproteinazy (*Metalloproteinases* – MMPs) stanowią rodzinę metalozależnych endopeptydaz degradujących macierz pozakomórkową (*extracellular matrix* – ECM). MMPs uczestniczą w szeregu fizjologicznych i patologicznych procesów. Zwiększona aktywność wielu enzymów zanotowana została w rozrostach nowotworów i ich przerzutach, zapaleniu stawów, chorobach przyzębia, miażdżycy, restenozie, kardiomiopatii rozstrzeniowej, zawale mięśnia sercowego oraz w niektórych chorobach skóry [1,2,3]. Istotną grupę enzymów biorących udział w wyżej wymienionych procesach stanowią metaloproteinazy, nazywane również kolagenazami (*collagenases*) lub matryksynami (*matrixins*) [4]. W warunkach fizjologicznych są odpowiedzialne za skład tkanki łącznej. Ich stężenie wzrasta w chorobach związanych z zaburzeniami w tworzeniu i degradacji macierzy tkanki łącznej, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, *osteoarthritis*, owrzodzenia rogówki, stwardnienie rozsiane, miażdży-

ca, zapalenie przyzębia oraz autoimmunologiczne choroby skóry. Stwierdzono, że odgrywają one również rolę w inwazji przerzutowych komórek nowotworowych oraz angiogenezie [5]. Do rodziny metaloproteinaz należą również enzymy ulegające ekspresji po zawale mięśnia sercowego i odpowiedzialne za degradację substancji pozakomórkowej w myocardium [6].

Funkcja i pochodzenie metaloproteinaz

Macierz międzykomórkowa tworzy rusztowanie dla komórek i stabilizuje strukturę tkanek budujących skórę. Jej składowe uczestniczą w procesach proliferacji komórek, różnicowania i migracji, a także wpływają na ich kształt i metabolizm. Spełnianie tych funkcji umożliwia stan dynamicznej równowagi między syntezą a degradacją zawartych w ECM cząsteczek. Metaloproteinazy macierzy posiadają zdolność trawienia kolagenu, fibronektyny, elastyny,

lamininy i innych proteoglikanów, glikoprotein. Są również jednym z głównych składników odpowiadających za prawidłowy skład macierzy. Umiejscowione są na powierzchni przodującej wędrujących komórek i to powoduje degradację białek tylko w linii przemieszczania się komórek. Właśnie przebieg tego procesu ma szczególne znaczenie w przebudowie tkanki łącznej i angiogenezie [7].

Ekspresja genów metaloproteinaz występuje prawie we wszystkich komórkach, tak stacjonarnych – fibroblastach, keratynocytach, makrofagach, komórkach endotelialnych, komórkach dendrytycznych Langerhansa, neuronach, komórkach mikrogleju, miocytach, jak i w komórkach nacieku zapalnego – monocytach, limfocytach T oraz leukocytach [7,8]. Wykazano, że komórki mięśni gładkich naczyń, monocyty oraz komórki śródbłonna naczyń produkują MMPs, które uczestniczą w budowie macierzy pozakomórkowej, migracji i infiltracji komórkowej [9,10].

Głównym źródłem MMP są komórki nacieku zapalnego. Wydaje się, że parakrynno/autokrynnny wpływ różnych cytokin na komórki nacieku zapalnego i komórki skóry może prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy ilością a aktywnością metaloproteinaz i ich inhibitorów. Prowadzi to do zmian w architekturze macierzy pozakomórkowej [11]. Wyniki badań wykazały, że zredukowane stężenie TIMP w surowicy i tkankach może prowadzić do degradacji i przebudowy macierzy pozakomórkowej [12].

Metaloproteinazy stanowią rodzinę metalozależnych (Zn^{2+} i Ca^{2+}) endopeptydaz [8,13]. Do chwili obecnej poznano 28 proteinaz i 4 ich inhibitory. Metaloproteinazy różnią się między sobą substratami, w stosunku do których wykazują właściwości trawiące. Wyróżniono charakterystyczne domeny wspólne dla całej rodziny peptydaz oraz inne, które decydują o specyficznych właściwościach poszczególnych enzymów [7]. MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10 posiadają zdolność trawienia elastyny, fibronektyny, lamininy, plazminogenu i kolagenu typu I, II, III, VII, X i IV, co powoduje uszkodzenie błony podstawnej naczyń krwionośnych, a w konsekwencji ułatwia migrację komórek śródbłonna. MMP-12, -8 wydzielane przez neutrofile i makrofagi, degradują także różne typy kolagenu oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej, nieznane są natomiast substraty dla pozostałych opisanych metaloproteinaz.

Wykazano, że brak jonów Ca^{2+} zahamowuje uaktywnianie endopeptydaz, natomiast dodanie tych jonów przywraca ich aktywność [14]. Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki badań Reinhardta i wsp., którzy stwierdzili, że właśnie aktywacja, a nie synteza *de novo* metaloproteinazy warunkuje jej funkcje [15]. Uczynienie metaloproteinaz może odbywać się na drodze zewnętrznej i wewnątrzkomórkowej. Proces zewnątrzkomórkowej aktywacji, dotyczący MMPs niezwiązanych z błoną komórkową, jest wieloetapowy, a powstające produkty pośrednie katalizują jego kolejne etapy, co pozwala na precyzyjną regulację aktywności enzymów. W procesie aktywacji uczestniczą także inne układy proteolityczne, takie

jak tkankowy aktywator plazminogenu, czy katepsyna B. Wewnątrzkomórkowa aktywacja niektórych metaloproteinaz (m.in. metaloproteinaz typu błonowego, MMP-11) jest katalizowana przez enzym – furynę [16].

Enzymy te produkowane są i wydzielane w nieaktywnej proformie latentnej, a następnie aktywowane w środowisku zewnątrzkomórkowym. Aktywacja polega na utracie peptydu o masie 10 kDa z N-terminalnego regionu białka – rozerwaniu wiązania Zn^{2+} -cysteina, która blokuje reaktywność miejsca aktywnego enzymu. Niezbędnym warunkiem do pobudzenia komórek do produkcji MMP jest obecność kolagenu. Zdolność wydzielania kolagenaz posiadają również niektóre bakterie Gram (-) związane z agresywnymi postaciami zapalenia przyzębia, np. *Porphyromonas gingivalis*. Dowiedzono, że bakteryjne enzymy proteolityczne mogą także stymulować ludzkie komórki nabłonka oraz fibroblasty do produkcji proteaz [6]. Udowodniono, że zdolność działania MMPs zależy także od pH tkanki [17]. Większość metaloproteinaz działa w pH neutralnym lub lekko zasadowym [4,17,18]. Maksymalną czynność proteolityczną tych enzymów obserwowano w pH = 8. Warto zwrócić uwagę, że inne proteazy są aktywne w środowisku kwaśnym („zapalnym”) [17].

Podział metaloproteinaz

Na podstawie struktury biochemicznej oraz specyficzności substratu metaloproteinazy dzieli się na trzy grupy:

1. specyficzne kolagenazy, rozszczepiające kolagen śródmiąższowy (I, II, III, VII, VIII, X) oraz zdenaturowany kolagen (żelatynę); należą do nich MMP-1 oraz MMP-8.
2. żelatynazy, degradujące kolageny typu IV, V, VII, IX, fibronektynę, elastynę, a także działające synergistycznie z kolagenazami przez degradację żelatyny; należą do nich MMP-2 oraz MMP-9.
3. stromielizyny, mające szeroką specyficzność i degradujące kolageny błony podstawnej oraz proteoglikany i glikoproteiny macierzy; należą do nich MMP-3 oraz MMP-10 (Stromelysin-2).

Inne metaloproteinazy nie zakwalifikowane do powyższych grup to: matrylizyna, metaloelastaza, metaloproteinaza typu błonowego [4,8,18].

Stężenie i aktywność MMPs w tkankach regulowane jest przez wiele czynników:

- a) na poziomie transkrypcji przez cytokiny (IL-1, TNF- α), hormony (parathoron-PTH), produkty bakteryjne (lipopolisacharyd),
- b) na poziomie sekwestracji enzymów do pęcherzyków wewnątrzkomórkowych,
- c) na poziomie aktywacji proenzymu (jony metali, oksydanty, detergenty, inne enzymy proteolityczne, plazmina),

- d) na poziomie specyficzności substratu,
- e) poprzez pH środowiska,
- f) przez tkankowe inhibitory proteinaz (TIMP) oraz inhibitory proteaz serynowych – serpiny.

Inhibitory proteinaz

Jak już wspomniano powyżej w warunkach fizjologicznych stężenie MMPs jest regulowane także przez naturalne niespecyficzne inhibitory proteaz: $\alpha 2$ makroglobulinę i $\alpha 1$ antyproteazę oraz specyficzne tkankowe inhibitory metaloproteinaz [4,7,19,20]. Inhibitory produkowane są przez te same komórki, które wytwarzają metaloproteinazy [7,9,20]. Są one rodziną czterech strukturalnie spokrewnionych ze sobą białek, sprawujących podwójną kontrolę nad MMPs. Stwierdzono, że zarówno hamują one proces przejścia pro- MMPs w MMPs, jak też i ich aktywne formy.

Tkankowe inhibitory proteinaz obecne są w przestrzeniach międzykomórkowych, w osoczu krwi i w innych płynach ustrojowych. Dwa z nich TIMP-1 i TIMP-2 produkowane są w formie rozpuszczalnej oraz wykrywane w surowicy krwi, a TIMP-3 jest nierozpuszczalny i związany z macierzą międzykomórkową [21].

Głównym inhibitorem MMPs jest produkowana przez większość komórek glikoproteina o masie 30 kD – TIMP-1. Drugim jest nieglikozylowana proteina, wytwarzana przez fibroblasty i komórki endotelialne – TIMP-2, mająca zdolność wiązania z prozelatynazą A i kontrolującą jej aktywację. Ekspresja TIMP-1 jest również regulowana przez cytokiny, głównie przez interleukinę 1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), a także czynnik wzrostu nowotworów (TGF- β), interleukiny-6 i 10 (IL-6, IL-10) [18,22-25]. IL-1 indukuje syntezę metaloproteinaz i proteinaz serynowych, ale również hamuje syntezę TIMP-1 [22,26,27]. Wpływ TNF- α jest zbliżony do działania IL-1, a obie cytokiny działają synergistycznie, co potęguje ich efekt kataboliczny [28]. Nie wykazano natomiast podatności TIMP-2 na działanie cytokin [25]. TIMP-3 – nierozpuszczalny inhibitor regulowany jest przez czynniki pobudzające mitozę – między innymi przez czynnik wzrostu nowotworów β (TGF- β), a hamowany przez TNF- α . Jednakże ekspresja mRNA dla TIMP-3 w skórze jest wykrywana tylko w mieszkach włosowych i komórkach otaczających gruczoły potowe [29].

Tkankowe inhibitory tworzą klasyczne niekowalentne wiązania, łącząc się w dwucząsteczkowe kompleksy z aktywną formą MMPs, czasem również z ich latentnymi prekursorami. Regulują one degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, zarówno przez eliminację proteinaz, jak i blokadę aktywacji MMPs [8].

Regulacja aktywności metaloproteinaz

Zachwianie równowagi pomiędzy metaloproteinazami a ich inhibitorami często jest przyczyną destrukcji tkanki

w różnych chorobach [30]. Badania wielu autorów wskazują, że chociaż stężenia TIMPs w zajętych tkankach są podwyższone, nie kompensują one podwyższonej aktywności enzymów proteolitycznych [26,31,32].

Wykazano także, że czynniki pozaustrojowe posiadają zdolność hamowania metaloproteinaz. Mechanizm działania syntetycznych inhibitorów MMPs nie jest do końca poznany. Stwierdzono, że takie działanie posiadają tetracykliny (niskie dawki doxycykliny – 20 mg 2 x na dobę). Prawdopodobnie jest to spowodowane ich zdolnością do tworzenia kompleksów z wapniem oraz cynkiem (chelatacja jonów wapnia i cynku), które jak wiadomo są niezbędnymi pierwiastkami dla prawidłowego funkcjonowania MMPs. Potwierdzają to obserwacje, iż nadmiar jonów tych metali może odwrócić proces hamowania enzymów spowodowany przez tetracykliny [33].

Wykazano, że podobne działanie wywierają również: cytokiny przeciwzapalne, np. interferon γ (IFN- γ), interleukina-4 (IL-4), jak również deksametazon i indometacyna. Czynniki te hamują wytwarzanie prostaglandyny 2 (PGE-2) i cyklicznego AMP (cAMP), które pośredniczą w wytwarzaniu MMPs [34].

Zmiany ekspresji lub aktywności poszczególnych metaloproteinaz powodują zachwianie równowagi pomiędzy degradacją a syntezą składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W konsekwencji prowadzi to do powstania określonych procesów patologicznych w skórze i narządach wewnętrznych, szczególnie ważnych w chorobach tkanki łącznej, owrzodzeniach żylnych podudzi, łuszczycy, pemfigoidzie czy nowotworach.

Badania ostatnich lat prowadzone w celu wyjaśnienia etiopatogenezy chorób autoimmunologicznych takich jak choroby pęcherzowe czy twardzina, wskazują na prawdopodobną rolę, jaką odgrywają przedstawione enzymy i ich inhibitory.

Rola metaloproteinaz w patogenezie pemphigoidu

Pemphigoid jest dermatozą pęcherzową o podłożu autoimmunologicznym. Zmiany skórne mają charakter dobrze napiętych pęcherzy zlokalizowanych w obrębie skóry pozornie niezmięnionej, jak i na podłożu rumieniowym. U około 25% mogą dotyczyć błon śluzowych. Objawy podmiotowe, które mogą towarzyszyć zmianom skórnym to świąd i pieczenie skóry. Do rozpoznania choroby przydatne jest badanie histopatologiczne, w którym obserwuje się pęcherz podnaskórkowy z obecnością granulocytów obojętno- i kwasochłonnych oraz nacieki, głównie wokółnaczyńniowe, złożone z neutrofilii, limfocytów i eozynofili. Jednakże o rozpoznaniu rozstrzyga badanie immunopatologiczne metodą immunofluorescencyjną bezpośrednią (*direct immunofluorescence* – DIF), w którym stwierdza się złogi immunoglobulin IgG, rzadko innych klas i komplementu wzdłuż błony podstawnej naskórka. Badania ultrastrukturalne wykazały intensywny

naciek zapalny na granicy skórno-naskórkowej, destrukcję hemidesmosomów oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej.

W części przypadków w badaniu immunofluorescencyjnym pośrednim (*indirect immunofluorescence* – IIF) stwierdza się w surowicy krążące przeciwciała skierowane przeciwko antygenom błony podstawnej naskórka (*basement membrane zone* – BMZ). Antygeny te znajdują się wewnątrz półdesmosomów oraz w lamina lucida i są nimi glikoproteiny o masach cząsteczkowych 230 (BPAG 1) i 180 kD (BPAG 2). BPAG 1 należy do rodziny białek zwanych plakinami. Są to białka wewnątrzkomórkowe, które łączą filament pośredni szkieletu komórki z desmosomami i hemidesmosomami [35]. Uważa się, że przeciwciała skierowane przeciwko tej glikoproteinie powstają w wyniku uszkodzenia keratynocytów i uwolnieniu determinant biorących udział w odpowiedzi autoimmunologicznej. Najważniejszym antygenem w patogenie pemfigoidu jest BPAG 2, czyli białko przezbłonowe, należące do rodziny genów kolagenu, którego najbardziej immunogenną część stanowi fragment NC16a. Miano przeciwciał skierowanych przeciwko temu fragmentowi koreluje z aktywnością procesu chorobowego [36]. Schimdt i wsp. stwierdzili, że w wyniku wiązania auto-przeciwciał z antygenem 180 kD następuje pobudzenie keratynocytów i uwalnianie przez nie interleukiny-6 i interleukiny-8 oraz aktywacja składowej C5 dopełniacza. Dochodzi także do aktywacji mastocytów i neutrofilów. Uważa się, że niezbędnym czynnikiem do rozerwania połączeń skórno-naskórkowych jest obecność przeciwciał i składowych dopełniacza [37]. Uwalniane przez komórki nacieku zapalnego oraz keratynocyty metaloproteiny macierzy, w tym elastaza neutrofilowa, prowadzą w konsekwencji do powstawania pęcherzy, w których także stwierdzono obecność IL-1, IL-2, troboszanów i leukotrienów oraz prostaglandyn [38]. W keratynocytach warstwy podstawnej pobranych z pęcherzy dłużej trwających z widocznym naskórkowaniem stwierdzano, częściej niż dla innych metaloprotein, mRNA dla kolagenazy. Badania części autorów wykazały, że chociaż migracja keratynocytów jest związana z ekspresją kolagenazy, to jednak kontakt keratynocytów z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej nie jest konieczny do indukcji tego enzymu [39].

W badaniach płynu pobranego z samoistnych i sprowokowanych pęcherzy, w których oznaczano aktywność kolagenazy stwierdzono dwie izoformy tego enzymu: cząsteczki 92 kD i 72 kD. Bardzo wysoką aktywność wykazywała u pacjentów z pemfigoidem pęcherzowym, izoforma 92 kD. Badania ekspresji tego enzymu podczas naskórkowania zmian potwierdziły wzrost ekspresji izoformy 92 kD podczas regeneracji i migracji komórek naskórka. Doświadczenia te mogą wskazywać na znaczącą

rolę tego enzymu w fizjologii i zachowaniu integralności prawidłowej skóry. Jednocześnie Oikarinen i wsp. potwierdzili ważną rolę zewnętrznych glikokortykosteroidów w redukcji ekspresji i aktywności kolagenazy – 92 kD, a tym samym ich wpływ na zmniejszenie destrukcji tkanek w tej chorobie [40].

Badania płynu z pęcherzy wykonane przez innych autorów wykazały także obecność w nim inhibitorów metaloproteinaz, w tym kolagenazy. W nowopowstałym pęcherzu (4 godziny) poziom inhibitora kolagenazy odpowiadał stężeniu tego inhibitora w surowicy. Następnie jego stężenie gwałtownie rosło, osiągając największe wartości po 48 godzinach. Wydaje się, że wzrastający poziom inhibitora metaloproteinaz odpowiada za ograniczenie destrukcji tkanek i rozpoczęcie procesu ich naprawy [41].

Badając mechanizmy tworzenia pęcherzy autorzy oznaczali aktywność metaloproteinaz z płynu pobranego z pęcherzy w różnych chorobach pęcherzowych. W doświadczeniach przeprowadzonych u pacjentów z zapaleniem opryszczkowatym skóry (*dermatitis herpetiformis* – DH), pęcherzycą zwykłą (*pemphigus vulgaris* – PV) i pemfigoidem pęcherzowym (*pemphigoid bullous* – PB) oznaczano stężenie kolagenazy i elastazy. Podczas gdy aktywność pierwszego enzymu była podobna we wszystkich wymienionych chorobach to aktywność elastazy różniła się znacznie, była największa w *dermatitis herpetiformis*. Stwierdzono poza tym, że aktywność elastazy w pęcherzach chorych z PV i BP była blokowana przez Na₂EDTA, podczas gdy elastaza z pęcherzy u chorych na DH ulegała zahamowaniu głównie przez fenylometylosulfonyl (PMSF), a nie przez Na₂EDTA. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że elastaza w DH pochodzi głównie z granulocytów wielojądrowych nacieku wokół zmian chorobowych [42].

Na modelach mysich pemfigoidu pęcherzowego (ryc. 1) Verraes i wsp. oceniali udział elastazy neutrofilowej i 92 kD żelatynazy (MMP-9) w formowaniu pęcherza poprzez proteolityczną degradację antygeny BP 180. Wykazano zarówno w wycinkach ze zmian skórnych, jak i w płynie pobranym z pęcherza obecność obu tych enzymów. Jednakże elastaza była aktywną formą, natomiast metaloproteinaza 9 występowała jedynie w postaci proenzymu. W doświadczeniach proteolizy antygeny BP 180kD przez rekombinowane enzymy elastazę neutrofilową i MMP-9 oraz płyn pęcherzowy pobrany od chorych, stwierdzono podobny sposób degradacji tego antygeny tylko w wyniku działania elastazy neutrofilowej i płynu pęcherzowego. Degradacja rekombinowanego antygeny BP 180kD wywołana przez płyn mogła być zatrzymana tylko przez specyficzny inhibitor elastazy, co wskazuje na bezpośredni wpływ tego enzymu, a nie MMP-9 na formowanie pęcherza w pemfigoidzie [43].



Ryc. 1. Pemfigoid

Rola metaloproteinaz w patogenezie opryszczkowego zapalenia skóry

Opryszczkowate zapalenie skóry jest zespołem skórno-jelitowym o wspólnej etiopatologii z celiakią. Choroba trzewna o dowiedzionym podłożu autoimmunologicznym jak i choroba Dühringa spowodowana jest nietolerancją glutenu – białka zbóż europejskich. W opryszczkowatym zapaleniu skóry, będącym dermatozą pęcherzową, zmiany chorobowe dotyczą w mniejszym stopniu jelita, natomiast główną przyczyną dolegliwości chorych są wykwity skórne i towarzyszący świąd.

Obserwowane w tej chorobie zmiany skórne cechują się wielopostaciowością. Na obraz kliniczny składają się: grudki, rumienie, drobne pęcherzyki o układzie wianuszkowatym i dobrze napiętej pokrywie oraz bąble pokrzywkowe [44-48]. W badaniu histologicznym stwierdzane są pęcherze podnaskórkowe [49]. Nieznany jest mechanizm bardzo często obserwowanej predylekcji zmian skórnych do określonych okolic ciała. Tłumaczy się to zjawisko wpływem czynników fizycznych – większą wrażliwością skóry na urazy oraz zaburzeniami immunologicznymi [47].

Nadal dyskutuje się o zagadnieniu obecności złogów IgA w pozornie zdrowej skórze, niewiążące się z wystąpieniem grudek czy pęcherzy. Istnieje hipoteza, że do aktywacji procesów zapalnych konieczna jest pewna krytyczna masa złogów w skórze lub że w miejscach wykwitów działa dodatkowo inicjujący element sieci cytokinowej, na przykład IL-1 uwalniana w naskórku, w miejscach narażonych na ucisk [50] lub zmieniona aktywność enzymów degradujących macierz.

Rozwój pęcherza zapoczątkowany jest gromadzeniem neutrofilów w brodawkach skórnych tworzących mikroropnie Pierarda. Są one szybko transformowane przez obrzęk i stan zapalny w mikropecherzyki, łączące się następnie w większe pęcherze podnaskórkowe [44]. Pojawienie się neutrofilów poprzedza wczesna akumulacja w skórze limfocytów o profilu CD4⁺, wydzielających głów-

nie INF- γ , TNF- α i interleukiny-2, które to cytokiny powodują powstanie późniejszych nacieków z komórek wielojądrazstych [49,51,53].

Z badań eksperymentalnych wynika, że w okresie tworzenia się pęcherza dochodzi do zwiększonej produkcji IL-4 i IL-5 [51,54]. Powoduje to zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych (ELAM, ICAM) na komórkach śródbłonna, napływ neutrofilów i eozynofików do naskórka. W warstwie podstawnej naskórka zaobserwowano także podwyższenie stężenia interleukiny 8 (IL-8), która jest silnym chemoatraktantem dla neutrofilów. Zwiększone stężenie czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) stwierdzone w komórkach dendrytycznych obecnych w połączeniach skórno-naskórkowych, oprócz aktywacji neutrofilów, jest odpowiedzialne za indukcję receptorów dla immunoglobulin klasy A [52,55]. Dodatkowo aktywacja kaskady dopełniacza przez przeciwciała IgA oraz kompleksu atakującego błonę (MAC) może być jednym z mechanizmów wpływających na migrację neutrofilów do brodawek skórnych i niszczenie błon komórkowych [56]. Neutrofile tworzące nacieki w skórze uwalniają enzymy degradujące macierz i trawiące złogi IgA [53].

W DH charakterystyczny jest obraz histologiczny z naciekami zapalnymi i destrukcją kolagenu IV i lamininy w błonie podstawnej, które następnie prowadzą do powstania pęcherza ponad blaszką ciemną błony podstawnej. Spośród metaloproteinaz tylko kolagenaza powoduje degradację włókien kolagenu typu I, II, III, i X, ale nie jest ona zdolna do zniszczenia składników błony podstawnej. Natomiast obecność tego enzymu jest niezbędna do migracji keratynocytów, które produkują wiele cytokin. Ze względu na znany mechanizm pobudzania wydzielania wielu metaloproteinaz przez składniki sieci cytokinowej zbadano aktywność innych proteaz macierzy komórkowej i ich wpływ na powstanie wykwitów w przebiegu opryszczkowatego zapalenia skóry. Stwierdzono zwiększoną ekspresję metaloproteinaz takich jak: kolagenaza-1 (MMP-1) i stromelizyna-1 (MMP-3), które przyczyniają się do formowania pęcherza poprzez degradację elementów błony podstawnej takich jak, kolagen VII i IV oraz laminina-1 [8,11].

W badaniu immunohistochemicznym wycinków skórnych, pobranych w różnych stadiach tworzenia pęcherza, badano aktywność stromielizyny oraz żelatynazy i matrylizyny, należących do elastaz [2]. Airola i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję kolagenazy w keratynocytach warstwy podstawnej zarówno we wczesnych, jak i dłużej trwających zmianach w DH. Jednocześnie stwierdzili, że do produkcji tego enzymu dochodzi tylko w keratynocytach tej warstwy, a nie w zróżnicowanych [59]. Interakcje pomiędzy keratynocytami a macierzą międzykomórkową zachodzą przez integryny – cząsteczki adhezyjne i prowadzą do produkcji kolagenazy. Ekspresja tego enzymu w keratynocytach jest hamowana przez lamininę,

a pobudzana przez obecność I i IV typu kolagenu. Destrukcyjność lamininy, która ma miejsce w powstawaniu pęcherza w opryszczkowatym zapaleniu skóry jest wystarczającym bodźcem do produkcji większej ilości kolagenazy [60,61].

W większości badanych wycinkach skóry chorych na DH stwierdzono także zwiększoną aktywność stromielizyny -1. Enzym ten degraduje białka błony podstawnej i aktywuje tkankową prokolagenazę [62]. Natomiast nie wykazano zwiększonej ekspresji matrylizyny w badaniu wycinków skóry chorych na DH, chociaż metaloproteinaza ta również powoduje proteolizę białek błony podstawnej, takich jak entaktyna oraz IV typ kolagenu, a także jest aktywatorem kolagenazy [63].

W płynie pobranym z pęcherza u chorych z opryszczkowatym zapaleniem skóry (ryc. 2) stwierdzono obecność kolagenazy i elastazy – enzymów prawdopodobnie uwalnianych przez neutrofile i mających udział w niszczeniu błony podstawnej i tworzeniu pęcherza [64,65]. Dodatkowo w procesie tym biorą udział keratynocyty i makrofagi otaczające naciek neutrofilowy, które uwalniają enzymy degradujące macierz. W doświadczeniach z oznaczaniem aktywności kolagenazy, gelatynazy i elastazy w płynie z pęcherzy powstałych spontanicznie i indukowanych jodkiem potasu u chorych z opryszczkowatym zapaleniem skóry wykazano wysoką aktywność tych enzymów w obu rodzajach pęcherzy. Badanie za pomocą chromatografii przepływowej wykazało, że znaczna część enzymów jest wydzielana przez komórki nacieku zapalnego [66].



Ryc. 2. Opryszczkowate zapalenie skóry

Związek metaloproteinaz z twardziną układową

Twardzina układowa (*systemic sclerosis* – SSc) jest przewlekłą chorobą o podłożu autoimmunologicznym, w której dochodzi do nadmiernego gromadzenia kolagenu oraz innych składników tkanki łącznej w skórze i narządach wewnętrznych. Stwierdzono odkładanie kolagenu typu I, III, V, VI, VII, fibronektyny i tenascyny wokół naczyń krwionośnych, jak też na granicy między tkanką podskórną

i skórą właściwą [67,68]. Ostatnie badania wskazują na rolę enzymów macierzy i ich tkankowych inhibitorów w procesie włóknienia, zwłaszcza tkanki płucnej [69]. Pierwotna przyczyna gromadzenia się w nadmiernej ilości w skórze i narządach wewnętrznych kolagenu i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej nie jest do końca poznana. Jedną z rozpatrywanych teorii jest wzmożona synteza kolagenu lub zaburzenia jego degradacji [70].

Rozbieżne są wyniki oceniające produkcję kolagenu przez fibroblasty chorych na twardzinę układową. Część autorów wykazała prawidłową funkcję tych komórek, inni stwierdzili jednak zwiększone wytwarzanie kolagenu przez fibroblasty [71,72].

W pobranych fibroblastach od chorych na SSc stwierdzono zmienioną ekspresję niektórych MMPs, w tym kolagenaz [73]. W fibroblastach chorych na twardzinę trwającą około 3 lata, wykazano niską ekspresję mRNA dla MMP-1, -2, -3, a wysoką dla TIMP-1. Ekspresja mRNA dla TIMP-2 była podobna jak w grupie osób zdrowych. Badania wskazywały na nasilenie procesu włóknienia. Natomiast w grupie chorującej krócej niż rok wykazano podwyższoną ekspresję mRNA dla MMP-1 i MMP-3 oraz TIMP-1. U chorych, u których proces trwał ponad 6 lat nie stwierdzono podwyższonej ekspresji ani dla MMPs ani dla TIMPs [74]. Inne prowadzone badania wykazały u chorych na SSc różną aktywność kolagenazy – enzymu rozkładającego włókna kolagenowe [71,75].

Badania porównujące zdrowe fibroblasty i fibroblasty pacjentów z SSc wykazały w tych ostatnich niską aktywność MMP-1 i MMP-3 [75,76] oraz wyższą aktywność MMP-2 i TIMP-1 [76,77].

Doświadczenia przeprowadzono także na fibroblastach poddanych naświetlaniom promieniowaniem UVA-1 (340-400 nm) i stwierdzono, że ten rodzaj terapii twardziny powoduje wzrost w fibroblastach pobranych od chorych ekspresji MMP-1 [78]. Potwierdza to dotychczasowe doniesienia o korzystnym wpływie tej metody leczniczej w twardzinie.

W badaniach surowicy krwi u chorych na twardzinę stwierdzono niższy poziom MMP-9 niż w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki korelowały ujemnie ze stopniem zajęcia skóry przez proces chorobowy [79]. W innych doświadczeniach wykazano korelację pomiędzy stopniem zajęcia narządów wewnętrznych a podwyższonym stężeniem MMP-1 w surowicy chorych [80]. Natomiast nie obserwowano istotnych odchyśleń od wartości prawidłowych w stężeniu innych metaloproteinaz w surowicy chorych na SSc (w tym MMP-2) [69].

Yazawa i wsp. w 2000 roku wykazali, że podwyższone stężenie inhibitora tkankowego metaloproteinazy 2 (TIMP 2) może odgrywać pewną rolę w rozwoju twardziny układowej [69]. Inne badania potwierdziły wzrost w surowicy krwi chorych na SSc stężenia TIMP-1 [80,82]. Dowiedziono, że tkankowe inhibitory metaloproteinazy -1 i -2 wywierały stymulujący wpływ na wzrost fibroblastów

od chorych na twardzinę [83]. Prawdopodobnie tkankowe inhibitory metaloproteinaz stymulują wzrost fibroblastów skóry w parakrynnym lub autokrynnym mechanizmie i przyczyniają się do ekspansji populacji pobudzonych fibroblastów [81]. Część autorów potwierdziło także związek między stężeniem w surowicy krwi TIMP-1 a stopniem zajęcia przewodu pokarmowego, płuc i naczyń [80], a także między TIMP-2 a włóknieniem płuc [3,69]. W związku z tym postuluje się modulowanie przez ekspresję TIMP procesów włóknienia w SSc. Ukazały się także pojedyncze prace opisujące zależność między stężeniem TIMP-1 i TIMP-2 a zajęciem narządów wewnętrznych w twardzinie z ograniczonymi stwardnieniami (*morphea*) [82]. Istnieją kontrowersje dotyczące istnienia zależności pomiędzy mianami przeciwciał skierowanych przeciwko topoizomerazie 1 a stężeniami MMP i TIMP [82].

Powyższe doniesienia potwierdzają tezę, że zmieniona aktywność metaloproteinaz, jak i ich inhibitorów, odgrywa dużą rolę w patogenezie twardziny. Badania te powinny być pogłębione i wykorzystane podczas terapii polegającej na modulowaniu składu i przebudowy macierzy międzykomórkowej.

Biorąc pod uwagę stale rosnącą w ostatnich latach liczbę badań, dotyczących udziału metaloproteinaz w patologii chorób skóry, można się spodziewać w niedługim czasie klinicznego zastosowania ich inhibitorów. Prawdopodobnie możliwość farmakologicznego regulowania aktywności proteolitycznej poszczególnych MMPs, na przykład poprzez przeciwciała skierowane przeciwko tym enzymom, tworzy nowe perspektywy terapii w dermatologii.

Piśmiennictwo

- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF i wsp. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-210.
- Vaalamo M, Kariniemi AL, Shapiro SD. Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 499-505.
- Marasini B, Casari S, Zeni O i wsp. Stromelysin promoter polymorphism is associated with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2001; 40: 475-476.
- Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1996; 2: 70-76.
- Skotnicki JS. Design and synthetic considerations of matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann NY Acad Sci* 1999; 878: 61-72.
- Żebrowski M, Kierus-Gudaj A, Żebrowska A. Udział metaloproteinaz w patomechanizmach choroby niedokrwiennej serca. *Forum Kardiologów* 2003; 8: 53-57.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
- Birkedal Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64: 474-484.
- Fini ME, Cook JR, Mohan R i wsp. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. w: *Matrix metalloproteinases*. wyd. Parks W, Mehan R (red.), Academic Press, San Diego 1998; 300-356.
- Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E i wsp. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects. *Ann Biol Clin* 2003; 61: 147-158.
- Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J i wsp. Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2002; 27: 677-682.
- Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem* 2001; 80: 512-521.
- Birkedal Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res* 1993; 28: 500-510.
- Bhide M. Use of Fluorogenic Septapeptide Matrix Metalloproteinase Assay to Assess Responses to Periodontal Treatment. *J Periodontol* 2000; 71: 690-700.
- Reinhardt D, Sigusch HH, Hense J i wsp. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart* 2002; 88: 525-530.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-160.
- Korostoff JM. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40-kDa serine protease. *J Periodontol* 2000; 71: 353-360.
- Reynolds JJ. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 1994; 8: 312-319.
- Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 2002; 8: 344-348.
- Caterson B. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000; 19: 333-344.
- Leco K, Khokha R, Pavloff N i wsp. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994; 269: 9352-9360.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1916-1926.
- Lohmander LS. Metalloproteinases, tissue inhibitor and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 181-189.
- Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML i wsp. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk Genes Cells. 2003; 8: 515-523.
- Stearns M, Rhim J, Wang M. Interleukin-10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 189-196.
- Martel-Pelletier J. Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 1994; 70: 807-815.

27. Campbell IK. Recombinant human interleukin-1 stimulates human articular cartilage to undergo resorption and human chondrocytes to produce both tissue- and urokinase-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Acta* 1988; 967: 183-194.
28. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999; 40: 1-11.
29. Airola K, Ahonen M, Johansson N i wsp. Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle and cancer progression. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 437-447
30. Reynolds JJ, Meikle MC. The functional balance of metalloproteinases and inhibitors in tissue degradation: relevance to oral pathologies. *J R Coll Surg Edinb* 1997; 42: 154-160.
31. Su S. Expression of the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int* 1999; 18: 183-191.
32. Dean DD. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-685.
33. Nip LH. Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines. *J Periodontal Res* 1993; 28: 379-385.
34. Larry M, Corcoran W. Regulation of Monocyte/Macrophage Metalloproteinase Production by Cytokines. *J Periodontol* 1993; 64: 467-473.
35. Stanley JR. Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Adv Immunol* 1992; 53: 291-325.
36. Schmidt E, Obe K, Brocker EB i wsp. Serum levels of autoantibodies to BP 180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000; 136: 253-254.
37. Schmidt E, Reimer S, Kruse N i wsp. Autoantibodies to BP 180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842-848.
38. Grando SA, Glukhenky BT, Drannik GN i wsp. Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1989; 125: 925-930.
39. Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Airola K i wsp. Interstitial collagenase is expressed by keratinocytes that are actively involved in reepithelialization in blistering skin disease. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 982-988.
40. Oikarinen A, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H i wsp. Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 205-210.
41. Welgus HG, Bauer EA, Stricklin GP. Elevated levels of human collagenase inhibitor in blister fluids of diverse etiology. *J Invest Dermatol* 1986; 87: 592-596.
42. Oikarinen AI, Zone JJ, Ahmed AR i wsp. Demonstration of collagenase and elastase activities in the blister fluids from bullous skin diseases. Comparison between dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 261-266.
43. Verraes S, Hornebeck W, Polette M i wsp. Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1091-1096.
44. Alexander J.O. *Dermatitis herpetiformis. Major problems in dermatology.* wyd. WB Saunders London: 1975.
45. Beutner EH, Chorzelski T, Bean S i wsp. *Dermatitis herpetiformis: Basic findings. w: Immunopathology of the skin.* wyd. Wiley Publication New York: 1979; 283-301.
46. Gawkrödger DJ, Blakwell JN, Gilmour HM. *Dermatitis herpetiformis: diagnosis, diet and dermatography.* Gut 1984; 25: 151-157.
47. Reunala T. *Dermatitis herpetiformis.* Clin Dermatol 2001; 19: 728-736.
48. Wankiewicz A, Gwieździński Z. Zapalenie opryszczkowe skóry w świetle wieloletnich badań. *Przegl Dermatol* 1999; 5: 491-497.
49. Garioch J, Baker B, Leonard J i wsp. T lymphocytes in lesional skin of patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1994; 131: 822-826.
50. Zone J, Meyer L, Petersen M. Deposition of granular IgA relative to clinical lesions in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1996; 132: 912-918.
51. Caproni M, Feliciani C, Fuligni A i wsp. Th2-like cytokine activity in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1998; 138: 242-247.
52. Graeber M, Baker B, Garioch J i wsp. The role of cytokines in the generation of skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1993; 129: 530-532.
53. Reitamo S, Reunala T, Kontinen Y i wsp. Inflammatory cells, IgA, C3, fibrin and fibronectin in skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1981; 105: 167-177.
54. Baker B, Garioch J, Bokth S i wsp. Absence of gluten specific T lymphocytes in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. *J Autoimmunity* 1995; 8: 75-82.
55. Hendrix J, Magnum K, Zone J i wsp. Cutaneous IgA deposits in bullous diseases function as ligands to mediate adherence of activated neutrophils. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 667-672.
56. Dahl M, Falk J, Carpenter R i wsp. Membrane attack complex of komplement in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1985; 121: 70-72.
57. Airola K, Reunala T, Salo S i wsp. Urokinase plasminogen activator is expressed by basal keratinocytes before interstitial collagenase, stromelysin-1 and laminin-5 in experimentally induced dermatitis herpetiformis lesions. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 7-11.
58. Airola K, Vaalamo M, Reunala T i wsp. Enhanced expression of interstitial collagenase, stromelysin-1 and urokinase plasminogen activator in lesions of dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol.* 1995; 15: 184-189.
59. Stahle-Backdahl M, Inoune M, Giudice G i wsp. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93: 2022-2030.
60. Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP i wsp. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression in human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest* 1993; 35: 2858-2866.
61. Stricklin GP, Nanney LB. Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 488-492.
62. Quantin B, Murphy G, Breatnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristic similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 1990; 28: 5327-5334.
63. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE i wsp. Stromelysin is an activator of procollagenase. *Biochem J* 1987; 248: 265-268.
64. Welgus HG, Bauer EA, Stricklin GP. Elevated levels of human collagenase inhibitor in blister fluids of diverse etiology. *J Invest Dermatol* 1986; 87: 592-596.
65. Salmela M, Pender S, Reunala T i wsp. Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions of patients with dermatitis herpetiformis. *Gut* 2001; 48: 496-502.
66. Oikarinen AI, Reunala T, Zone JJ i wsp. Proteolytic enzymes in blister fluids from patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1986; 114: 295-230.
67. Sollberg S, Mauch C, Eckes B. The fibroblast in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 279-285.

68. Peltonen J, Kahs'ri I, Uitto J. Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1829-1835.
69. Yazawa N, Kikuchi K, Ihn H i wsp. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 70-75.
70. Kikuchi K, Kubo M, Sato S i wsp. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 973-978.
71. Uitto J, Bauer E, Eisen A. Scleroderma: increased biosynthesis of triplehelical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase in skin fibroblasts in culture. *J Clin Invest* 1979; 64: 921-930.
72. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 1974; 54: 880-889.
73. Kirk T, Mark, Chua Ch i wsp. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 3423-3428.
74. Kuroda K, Shinaki 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: 567-572.
75. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H i wsp. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 359-363.
76. Bou-Gharios G, Osman J, Black C i wsp. Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clin Chim Acta* 1994; 231: 69-78.
77. Fakhoury H, Hillarby M, Weiss J. Increased gelatinase activity in systemic sclerosis dermal fibroblast cultures with unaltered gelatinase A mRNA expression. *J Dermatol Sci* 2002; 29: 62-69.
78. Gruss C, Reed J, Altmeyer P i wsp. Induction of interstitial collagenase (MMP-1) by UVA -1 phototherapy in morhea fibroblasts. *Lancet* 1997; 350: 1295-1296.
79. Kikuchi K, Kubo M, Hoashi T i wsp. Decreased MMP-9 activity in serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 301-305.
80. Toubi E, Kessel A, Grushko G i wsp. The association of serum matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors levels with scleroderma disease severity. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 221-224.
81. Mattila L, Airola K, Ahonen M i wsp. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 416-421.
82. Young-Min S, Beeton C, Laughton R i wsp. Serum TIMP-1, TIMP-2 and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon and in normal controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 846-851.
83. Kikuchi K, Kadono T, Furue M i wsp. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP 1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1995; 33: 973-978.