

(101)

Inhibitory proteaz w surowicach pacjentów z cukrzycową retinopatią prostą

Proteinases inhibitors in sera of diabetic patients with non-proliferative retinopathy

Piotr Skopiński^{1,2}, Barbara Duda-Król³, Anna Lipińska⁴, Ewa Sommer⁵, Adamina Borowska⁵, Małgorzata Filewska⁵, Jerzy Szaflik¹, Ewa Skopińska-Różewska⁵, Ewa Struzik¹

¹Z Katedry i Kliniki Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jerzy Szaflik

²Z Zakładu Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Moskalewski

³Z III Kliniki Chorób Wewnętrznych II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Łada

⁴Z Kliniki Chorób Wewnętrznych Oddziału Stomatologii Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Danuta Pfeiffer

⁵Z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ewa Skopińska-Różewska

Summary:

Diabetes is associated with a hypercoagulable state. Eighty percent of patients with diabetes mellitus die due to various thrombotic vascular complications. Disorder of coagulation and fibrinolysis is associated with diabetic retinopathy and nephropathy (1, 2, 3). Angiogenesis requires degradation of vascular basement membrane prior to migration and proliferation of endothelial cells. Various serine proteases play important role in this process.

The homeostatic system is also the source of endogenous inhibitors of angiogenesis (4, 5, 6). Human serum contains various factors able to induce or suppress formation of new blood vessels. The aim of the present study was to evaluate the activity of some angiogenesis inhibitors, anti-proteases, anti-thrombin III, α_1 anti-trypsin and α_2 anti-plasmin in sera of patients with diabetes mellitus type 1 and 2 and non-proliferative retinopathy, and to correlate this activity to total angiogenic potential of these sera, measured by mice cutaneous test. Sera of 22 persons with DM1, aged 33-70 years, 35 persons with DM2, aged 37-79 years, and 51 healthy people, aged 22-80 years (as control group) were studied. Direct serum-induced cutaneous angiogenesis test in mice (SIA) was applied (7, 8). Berichrom (ade Behring) tests and immunoturbidimetric method were used for evaluation of anti-proteases activity. Angiogenic activity of DM1 patients sera was statistically lower than this parameter in DM2 patients and in control group. Levels of anti-proteases were similar in DM1, DM2 and control group, with one exception: anti-thrombin level was lower in DM2 patients' sera than this in the control group. Analysis of correlation revealed important difference in behaviour of DM1 sera, as compared to other groups. Significant negative correlation was observed between angiogenic activity and anti-thrombin, as well as anti-trypsin level of DM1 patients' sera. On the other hand, correlation analysis performed for the sera of control group revealed significant positive correlation between their angiogenic activity and anti-thrombin level. No other correlations were found.

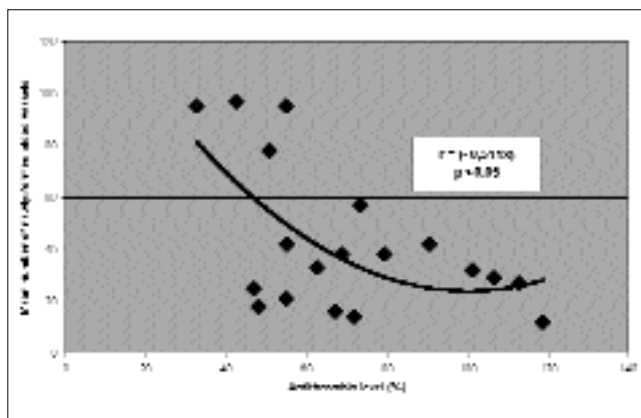
Słowa kluczowe: antytrombina III, α_1 -antytrypsyna, α_2 -antyplazmina, angiogeneza, retinopatia prosta, cukrzyca typu 1 (DM1) i typu 2 (DM2).

Key words: antithrombin III, α_1 -antitrypsin, α_2 -antiplasmin, angiogenesis, non-proliferative retinopathy, diabetes type 1(DM1) and type 2(DM2).

Wprowadzenie i cel pracy

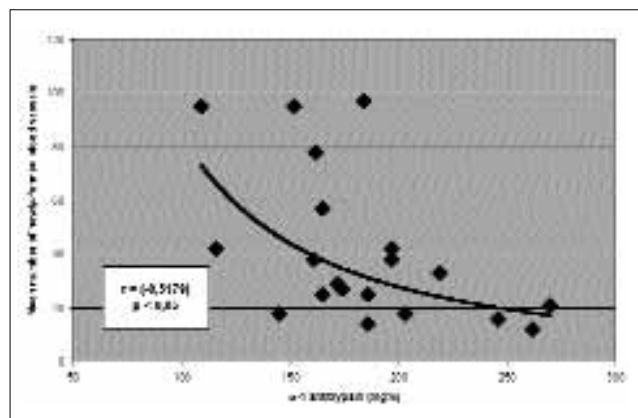
Cukrzyca towarzyszą zaburzenia w układzie hemostazy, manifestujące się podwyższoną krzepiwością krwi. W obrębie tego układu, a także w komórkach śródbłonna naczyniowego i układu odpornościowego działają enzymy proteolityczne pełniące funkcję

stymulatorów (trombina, plazmina, trypsyna) i inhibitorów (antytrombina, antyplazmina, antytrypsyna) angiogenezy (3-6, 9-12). Przejście od retinopatii prostej do proliferacyjnej może w jakimś stopniu mieć swoje źródło w zaburzeniu równowagi pomiędzy tymi czynnikami (13-15).



Ryc. 1. Ujemna korelacja pomiędzy aktywnością angiogenną surowic pacjentów z DM1 a zawartym w nich poziomem antytrombiny III.

Fig. 1. Negative correlation between angiogenic activity of DM1 retinopathy patients sera and their anti-thrombin III level.



Ryc. 2. Ujemna korelacja pomiędzy aktywnością angiogenną surowic pacjentów z DM1 a zawartym w nich poziomem α 1-antytrypsyny.

Fig. 2. Negative correlation between angiogenic activity of DM1 retinopathy patients sera and their α 1-antitrypsin level.

Celem pracy jest ocena aktywności powyższych trzech inhibitorów angiogenezy w surowicach DM1, DM2 i grupy kontrolnej i przeprowadzenie analizy korelacji pomiędzy tymi wartościami a aktywnością angiogenną surowic, mierzoną testem angiogenezy skórnej.

Material

Material stanowiły surowice separowane z krwi 51 zdrowych dawców w wieku od 22 do 80 lat, obojga płci; 22 chorych z retinopatią prostą i cukrzycą typu 1., obojga płci, w wieku od 33 do 70 lat oraz 35 chorych z retinopatią prostą i cukrzycą typu 2. w wieku od 37 do 79 lat, obojga płci.

Metody

Wykonano test angiogenezy skórnej w modyfikacji własnej (7,8). Grupom myszy Balb/c podawano śródskórnie po 0,05 ml surowicy w kilka miejsc na ogolonej skórze grzbietu w znieczuleniu ogólnym (wodzian chloralu podany dootrzewnowo). Po 72 godzi-

nach myszy uśmiercano Morbitalem i w mikroskopie operacyjnym liczono nowo powstałe naczynia krwionośne na wewnętrznej powierzchni skóry w powiększeniu 6x w 1/3 centralnej pola widzenia wokół punktu wstrzyknięcia surowicy. Badanie inhibitorów w surowicach przeprowadzano za pomocą zestawów Berichrom (Dade Behring) zgodnie z procedurami zalecanymi przez producenta. Na wykonanie badań uzyskano zgodę lokalnych komisji etycznych. Wyniki opracowano statystycznie (ANOVA, test Tukeya, analiza korelacji Pearsona).

Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabeli I i na rycinach (ryc. 1,2). Aktywność angiogenna surowic grupy DM1 była istotnie niższa niż w pozostałych grupach badanych. Aktywność trzech badanych antyproteaz nie różniła się w poszczególnych grupach, z wyjątkiem aktywności antytrombiny III, która była niższa w surowicach pacjentów z DM2 niż w kontroli. Wykazano istnienie statystycznie istotnej korelacji ujemnej pomiędzy aktywnością angiogenną surowic

	DM1	DM2	Kontrola Control	Statystyczne różnice pomiędzy grupami Statistical significance of differences	
				I	II
antithrombin III %	70,48 ± 5,6 n = 19	65,37 ± 4,4 n = 19	82,1 ± 5,9 n = 32	ns.	p < 0,05 vs. control
α 2-antiplasmin %	87,37 ± 5,4 n = 16	91,61 ± 4,7 n = 18	88,77 ± 5,0 n = 33	ns.	ns.
α 1-antitrypsin mg%	183,55 ± 9,3 n = 20	197,38 ± 7,2 n = 21	199,64 ± 9,8 n = 30	ns.	ns.
angiogenesis średnia liczba nowo utworzonych naczyń mean number of newly formed blood vessels ± se	40,99 ± 5,6 n = 22	63,2 ± 4,2 n = 35	53,53 ± 4,0 n = 51	p < 0,01 vs. type II 0,1 > p > 0,05 vs. control	ns. vs. control

Tab. I. Inhibitory proteaz w surowicach pacjentów z retinopatią cukrzycową prostą i odpowiedź neoangiogenna indukowana przez te surowice w skórnym mysim teście.

Tab. I. Antiproteinases inhibitors in sera of diabetic patients with background retinopathy and neovascular response induced by these sera in mice cutaneous test.

w grupie chorych na DM1 a ich zawartością antytrypsyny i antytrombiny (ryc. 1,2). W grupie kontrolnej stwierdzono **korelację dodatnią** pomiędzy poziomem antytrombiny a aktywnością angiogenną. Innych zależności nie stwierdzono.

Wnioski

Otrzymane wyniki analizy korelacji sugerują, że antytrombina III i α 1-antytrypsyna są ważnymi inhibitorami angiogenezy u chorych z retinopatią prostą i DM1. Nie uzyskaliśmy tej korelacji dla antyplazminy ($r = 0,0487$), co można tłumaczyć dwoistą rolą plazminy w procesie angiogenezy – jako jej stymulatora drogą uczyniania metaloproteaz i jako źródła inhibitorów – w tym angiostatyny (5,10). Interesujące wydają się brak jakichkolwiek korelacji w grupie DM2 oraz wystąpienie korelacji dodatniej ($r = 0,4213$) pomiędzy poziomem antytrombiny a aktywnością angiogenną w grupie kontrolnej. Otrzymane wyniki potwierdzają naszą sugestię zawartą w poprzedniej pracy (16), dotyczącą odmienności mechanizmów angiogenezy u chorych z retinopatią prostą typu DM1 i DM2.

PIŚMIENNICTWO: 1. Asakawa H., Tokunaga K., Kawakami F.: *Elevation of fibrinogen and thrombin- antithrombin III complex levels of type 2 diabetes mellitus patients with retinopathy and nephropathy*. J. Diabetes Complications, 2000, 14, 121-126. 2. Carr M.: *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J. Diabetes. Complications, 2001, 15, 44-45. 3. Yasanuga C., Nakashima Y., Sueishi K.: *A role of fibrynolytic activity in angiogenesis. Quantitative assay using in vitro method*. Lab. Invest., 1989, 61, 698-704. 4. Menashi S., Lu H., Soria C., Legrand Y.: *Endothelial cell proteases: physiological role and regulation*. Baillieres Clin. Haematol., 1993, 6, 559-576. 5. Hatzia Apostolou M., Katsoris P., Papadimitriou E.: *Different inhibitors of plasmin differentially affect angiostatin production and angiogenesis*. Eur. J. Pharmacol., 2003, 26, 1-8. 6. Sierko E., Zawadzki R., Wojtukiewicz Z.: *Czynniki układu hemostazy a angiogeneza w nowotworach*. Nowotwory, 2001, 51, 399-409. 7. Rogala E., Skopińska-Różewska E., Załęska J., Borowska A., Demkow U., Skopiński P., Dziedzic D., Langford R., Orłowski T.: *Ocena aktywności enzymu konwertują-*

cego Angiotensynę (ACE) oraz aktywność angiogenna surowic chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Onkol. Pol., 2002, 5, 139-142. 8. Barcz E., Skopińska-Różewska E., Kamiński P., Demkow U., Bobrowska K., Marianowski L.: *Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis*. Int. J. Gynecol. Obstetrics., 2002, 79, 229-235. 9. Zucker S., Mirza H., Conner C., Lorenz A., Drews M., Bahou W., Jesty J.: *Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation*. Int. J. Cancer, 1998, 75, 780-786. 10. Sierko E., Sierko P., Wojtukiewicz M.: *Angiostatyna – ukryty w układzie hemostazy naturalny inhibitor angiogenezy: perspektywy zastosowania w terapii przeciwnowotworowej*. Nowotwory, 2002, 2, 144-149. 11. Becker B., Heindl B., Kupatt C., Zahler S.: *Endothelial function and hemostasis*. Z. Kardiol., 2000, 89, 160-167. 12. Wiedermann C., Romisch J.: *The anti-inflammatory actions of antithrombin – a review*. Acta Med. Austriac., 2002, 29, 89-92. 13. Knapik-Kordecka M., Piwowar A., Warwas M.: *Levels of cystatin C, activity of antipapain in plasma of patients with diabetes mellitus type 2*. Wiad. Lek., 2000, 53, 617-622. 14. Bristow C., Di Meo F., Arnold R.: *Specific activity of alpha 1 proteinase inhibitor and alpha 2 macroglobulin in human serum: application to insulin-dependent diabetes mellitus*. Clin. Immunol. Immunopathol., 1998, 89, 247-59. 15. Di Mario U., Borseley D., Contreas G., Prowse C., Clarke B., Andreeani D.: *The relationship of soluble immune complexes, insulin antibodies and insulin-anti-insulin complexes to platelet and coagulation factors in type 1 diabetic patients with and without proliferative retinopathy*. Clin. Exp. Immunol., 1986, 65, 57-65. 16. Skopiński P., Szaflik J., Duda-Król B., Lipińska A., Sommer E., Chorostowska-Wynimko J., Demkow U., Skopińska-Różewska E.: *Aktywność angiogenna i stężenie VEGF w surowicach chorych na cukrzycę powikłaną retinopatią prostą*. Klinika Oczna in press.

Acknowledgement. The work was supported by grant of Scientific Poland Committee Nr. PO5B17223.

Praca wpłynęła do Redakcji 5.04.2004 r. (471).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

Piotr Skopiński
Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny
ul. Sierakowskiego 13
03-709 Warszawa