Starzenie się a ekspresja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniach

Aging and metalloproteinases expression in mussels extracellular matrix

Mateusz Bosiacki¹, Anna Lubkowska²✉

¹ Absolwent fizjoterapii I stopnia, Wydział Nauk o Zdrowiu, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Graduate of first degree physiotherapy, Faculty of Health Sciences, Pomeranian University of Medicine

² Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Zakład Diagnostyki Funkcjonalnej i Medycyny Fizykalnej, ul. Żołnierska 54, 71-210 Szczecin
Pomeranian Medical University in Szczecin, Department of Functional Diagnostics and Physical Medicine

✉ annalubkowska@gmail.com

ABSTRACT

Emerging traits of cachexia in the elderly are usually attributed to disease, reduced physical activity, reduced appetite, reduced metabolic rate, and reduced energy demand. Lower physical activity and malnutrition lead to sarcopenia, understood as age-related skeletal muscle loss, often associated with reductions in strength, speed of contraction, and muscle power. In addition, the loss of muscle mass observed in old age may be due to changes in the nervous and endocrine systems, changes in muscle metabolism, decreased cell proliferation capacity, chronic age-related inflammation and oxidative stress, chronic disease conditions, and use of pharmaceuticals.

Many diseases of muscle are accompanied by increased expression and activity of matrix metalloproteinases (MMP) from the zinc-dependent endopeptidase family, which are involved in the matrix remodeling process that accompanies muscle regeneration. Disorders of collagen accumulation resulting from changes in MMP expression may lead to pathological processes of muscle fibrosis.

With the exception of the membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP), MMP are synthesized in cells and secreted into the extracellular matrix (ECM). Secretory MMP can aggregate

on cell surfaces by binding to MT-MMP, along with molecules responsible for cell adhesion, integrins or proteoglycans. To date, over 20 subtypes of metalloproteinases have been classified, each coded by different genes.

MMP-induced degradation of structural matrix components (such as collagen, laminin, fibronectin) creates space for suitable cells and facilitates cell migration through the matrix. These enzymes are also involved in the regulation of cell activity and take part in inflammatory reactions. Many of the peptides released during partial ECM proteolysis may also act as signaling molecules with autocrine or paracrine action. MMPs also participate in cell-cell communication.

Under physiological conditions, MMP are expressed at a very low level in tissues. Induction of expression occurs only in times of ECM reconstruction. Due to their protease activity, these enzymes remain under strict multi-level regulation, i.e. at the level of transcription, post-translational processing, secretion, activation, and degradation. Active MMPs are regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases and by numerous cytokines and growth factors.

Keywords: matrix metalloproteinases; zinc-dependent endopeptidases; aging; muscle; extracellular matrix.

ABSTRAKT

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinase* – MMP) należą do rodziny cynkozależnych endopeptydaz. Enzymy te, z wyjątkiem błonowych metaloproteinaz (*membrane-type matrix metalloproteinase* – MT-MMP), są syntetyzowane w komórkach i ulegają sekrecji do macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM). Sekrecyjne MMP mogą występować na powierzchni komórki dzięki związaniu się z proteoglikanami, integrynami, z cząsteczkami odpowiedzialnymi za adhezję komórkową lub MT-MMP. Każdy z poznanych 20 podtypów metaloproteinaz kodowany jest przez inne geny. Degradacja strukturalnych składników macierzy (jak kolagen, laminina czy fibrynonektyna) przez MMP warunkuje utworzenie przestrzeni dla odpowiednich komórek oraz ułatwia m.in. migrację komórek przez macierz. Innymi funkcjami tych enzymów jest udział w regulacji aktywności komórek i w reakcjach zapalnych. Wiele peptydów uwolnionych w trakcie częściowej proteolizy ECM może pełnić także funkcje cząsteczek sygnałowych działających autokrynnie lub parakrynnie. Metaloproteinazy mogą też uczestniczyć w komunikacji między komórkami.

W warunkach fizjologicznych MMP w tkankach ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie. Indukcja ekspresji następuje dopiero w czasie przebudowy ECM. Aktywność proteazowa zapewnia, że enzymy pozostają pod ścisłą kontrolą na wielu poziomach regulacji, tj. na poziomie transkrypcji, obróbki potranslacyjnej, sekrecji, aktywacji i degradacji. Aktywne MMP podlegają regulacji przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz oraz przez liczne cytokiny i czynniki wzrostu.

U osób starszych cechy wyniszczenia organizmu przypisuje się zwykle procesom chorobowym, zmniejszonej aktywności fizycznej, zmniejszonemu łaknieniu, obniżeniu tempa metabolizmu i zapotrzebowania energetycznego. Zmniejszenie aktywności fizycznej i niedożywienie również mogą być jedną z przyczyn sarkopenii (postępującej z wiekiem utraty mięśni szkieletowych), która często związana jest ze zmniejszeniem siły, szybkości skurczu i mocy mięśni. Do utraty masy mięśniowej obserwowanej w starszym wieku mogą prowadzić ponadto zmiany w układzie nerwowym i hormonalnym, zmiany w metabolizmie mięśni, zmniejszenie zdolności proliferacji komórek, przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny, przewlekłe stany chorobowe

oraz stosowane leki. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej zaangażowane są w procesy przebudowy macierzy towarzyszące regeneracji mięśni, jednakże wzrost ich ekspresji i aktywności towarzyszy również wielu stanom chorobowym mięśni. Będące skutkiem zmian w ekspresji MMP zaburzenia

gromadzenia kolagenu mogą prowadzić do patologicznych procesów zwłóknienia mięśni.

Słowa kluczowe: metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej; endopeptydazy zależne od cynku; starzenie; mięśnie; macierz zewnątrzkomórkowa.

METALOPROTEINAZY MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Budowa i funkcje metaloproteinaz

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinase* – MMP) należą do rodziny cynkozależnych endopeptydaz. Wyróżnia się spośród nich: żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny, metaloproteiny błonowe oraz inne dotychczas niesklasyfikowane [1] (tab. 1).

TABELA 1. Podział metaloproteinaz na podstawie Jung i Zimowskiej [1]

Podgrupa	Metaloproteinaza	
Kolagenazy	MMP-1	kolagenoza 1
	MMP-8	kolagenoza 2
	MMP-13	kolagenoza 3
Stromelizyny	MMP-3	stromelizyna 1
	MMP-10	stromelizyna 2
	MMP-12	metaloelastaza
Pozostałe MMP archetypowe	MMP-19	
	MMP-20	enamelizyna
	MMP-27	
Matrylizyny	MMP-7	matrylizyna 1
	MMP-26	matrylizyna 2
Żelatynazy	MMP-2	żelatynaza A
	MMP-9	żelatynaza B
MMP wydzielnicze	MMP-11	
	MMP-21	
	MMP-28	
Typ błonowy MMP	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP
Typ II transbłonowy MMP	MMP-23A	
	MMP-23B	

Wszystkie MMP, z wyjątkiem błonowych (*membrane-type matrix metalloproteinase* – MT-MMP), są syntetyzowane w komórkach i ulegają sekrecji do macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM). Niemniej jednak sekrecyjne MMP mogą być skupione na powierzchni komórki dzięki związaniu się z MT-MMP, cząsteczkami odpowiedzialnymi za adhezję komórkową, integrynami lub proteoglikanami, co ułatwia

proteolizę [2]. Dotychczas sklasyfikowano ponad 20 podtypów metaloproteinaz, z których każdy kodowany jest przez inne geny. Metaloproteiny zostały jednak przyporządkowane do jednej grupy enzymów ze względu na homologiczne sekwencje, zbliżoną budowę i aktywność enzymatyczną [1]. W budowie enzymu można wyróżnić elementy wspólne, jak: peptyd sygnałowy, prodomena z motywem cysteinowym, domena katalityczna [3].

Prodomena, dzięki obecności reszty cysteinowej oddziałującej z atomem cynku w centrum aktywnym enzymu, jest zdolna do zablokowania aktywności katalitycznej enzymu. Domena katalityczna zawiera 3 reszty histydynowe w obrębie motywu wiążącego katalityczny jon cynku oraz resztę kwasu glutaminowego, która aktywuje związaną z cynkiem cząsteczkę wody niezbędną do aktywności enzymu. Domena ta zawiera ponadto dodatkowy atom cynku oraz od jednego do czterech atomów wapnia odpowiedzialnych za konformację enzymu. Domena hemopeksynowa łącząca się z regionem zawirowanym decyduje o rozpoznaniu substratu, wiązaniu MMP do macierzy zewnątrzkomórkowej, jest wrażliwa na działanie tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* – TIMP) [4]. Metaloproteiny błonowe zawierają domenę odpowiedzialną za wiązanie z błoną komórkową. Żelatynazy w domenie katalitycznej zawierają obszar odpowiedzialny za przyłączenie do kolagenu, żelatyny i lamininy [3].

Głównym substratem dla metaloproteinaz są składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Enzymy te, aktywne w obojętnym pH, katalizują degradację ECM towarzyszącą przebudowie i zmianom strukturalnym macierzy.

Degradacja strukturalnych składników macierzy, jak: kolagen, laminina, fibrynonektyna, pozwala nie tylko na utworzenie przestrzeni dla odpowiednich komórek, ale także ułatwia m.in. migrację komórek przez macierz [5]. Jednakże, jak dotychczas wykazano, enzymy te uczestniczą również np. w regulacji aktywności komórek i biorą udział w reakcjach zapalnych [5]. Ponadto wiele peptydów uwolnionych w trakcie częściowej proteolizy ECM może pełnić funkcje cząsteczek sygnałowych działających autokrynnie lub parakrynnie. Przykładem takiego działania jest peptyd uwolniony podczas degradacji kolagenu typu IV przez MMP-9, który wiążąc się z integryną $\alpha v \beta 3$, przeciwdziała angiogenezie [6].

Kataliza innych aktywnych biologicznie substancji, takich jak aktywne cząsteczki sygnałowe, może prowadzić do zahamowania lub zmiany ich działania. Zrębowy czynnik wzrostu (*stromal derived factor*), należący do cytokin aktywujących i indukowany przez prozapalne czynniki, jak czynnik martwicy nowotworu alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- α), po rozłożeniu przez MMP-2 staje się nieaktywny [7]. W ten

sposób MMP modyfikując strukturę lub przyłączanie czynników wzrostu i cytokin w macierzy zewnątrzkomórkowej, powodują zmianę szlaków sygnałowych w komórce. Przykładowo, aktywna MMP-9 powoduje uwolnienie czynnika wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor*) związanego z proteoglikanami macierzy zewnątrzkomórkowej. Metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 uwalniając proteolitycznie peptyd LAP (*latency-associated peptide*), uwalniają transformujący czynnik wzrostu beta (*transforming growth factor beta* – TGF- β) z obecnego w macierzy zewnątrzkomórkowej nieaktywnego kompleksu [8]. Metaloproteinazy uczestniczą także w komunikacji między komórkami oraz między komórkami a błoną podstawną, powodując np. proteolityczny rozpad E-kadheryny, co zmienia zdolność migracyjną komórek [8].

Dzięki takiej aktywności MMP odgrywają również istotną rolę nie tylko w regulacji takich procesów jak komunikacja międzykomórkowa, różnicowanie się i migracja komórek, ale także w przeżyciu komórki lub jej wejściu w apoptozę [3].

Mechanizmy regulacji ekspresji i aktywności metaloproteinaz

W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy w tkankach ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie. Indukcja ekspresji następuje dopiero w czasie przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. Ze względu na aktywność proteazową enzymy pozostają pod ścisłą kontrolą na wielu poziomach regulacji, tj. na poziomie transkrypcji, obróbki potranslacyjnej, sekrecji, aktywacji i degradacji [5]. Wiele cytokin i czynników wzrostu indukuje transkrypcję genów enzymów z rodziny MMP, jak np. interleukiny, interferon, czynnik wzrostu naskórka (*epidermal growth factor*), czynnik wzrostu keratynocytów (*keratinocyte growth factor*), czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor*), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor*), TNF- α i TGF- β .

Wykazano, że różne czynniki wzrostu i cytokiny działają w sposób zróżnicowany na indukcję ekspresji genów MMP. Dla przykładu mioblasty uzyskane z mięśni szkieletowych myszy i traktowane *in vitro* płytkopodobnym czynnikiem wzrostu (*platelet-derived growth factor*) lub insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (*insulin-like growth factor 1* – IGF-1) nie wpływały na wzrost ekspresji badanych MMP-1 i MMP-2, natomiast indukowały wzrost ekspresji MMP-9 [9]. Transkrypcja genów MMP może odbywać się również w sposób niezależny od działania cytokin i czynników wzrostu, np. MMP-2 ulega konstytutywnej ekspresji [10].

Regulacja ekspresji genów przez czynniki wzrostu i cytokiny MMP może się odbywać dzięki obecności sekwencji promotorowej (wykazującej wiele podobieństw wśród rodziny MMP), która jest wrażliwa na oddziaływanie z białkowymi aktywatorami transkrypcji *trans*, takimi jak białkowy aktywator transkrypcji 1 (*activator protein 1*) lub aktywator wzmacniający ekspresję genów wirusa polio (*polyomavirus enhancer activator 3*). Z kolei działanie tych aktywatorów polega na związaniu sekwencji *cis* promotorów, co umożliwia start transkrypcji.

Dotychczas wykazano także, że mimo podobieństwa regionów promotorowych w wielu MMP mogą one mieć odmienne

rozmieszczenie regionów regulatorowych, co tłumaczyć może tkankowo specyficzną ekspresję np. MMP-9 [10]. Wykazano także, że mechanizmy epigenetyczne, jak metylacja regionu promotorowego, fosforylacja czy acetylacja histonów, wpływają na wyciszenie lub wzrost ekspresji [11].

Metaloproteinazy są syntezowane w komórkach, a następnie ulegają sekrecji do macierzy zewnątrzkomórkowej w formie nieaktywnej, jako zymogeny i są aktywowane przez cięcie propeptydu [3]. Do dotychczas poznanych mechanizmów aktywacji należy ograniczona proteoliza katalizowana przez inne enzymy z rodziny MMP lub np. konwertazy, furyny, jak również, w niektórych przypadkach, reaktywne formy tlenu (ROS) [3].

Aktywne metaloproteinazy podlegają regulacji przez TIMP, które wiążą się niekowalencyjnie do domeny katalitycznej, hamując ich aktywność. Regulacja aktywności metaloproteinaz jest ściśle ustalona, ze względu na ich zdolność do masowej degradacji tkanek [12]. Inhibitory TIMP hamują aktywność MMP przez przyłączenie N-końca do centrum aktywnego enzymu w miejscu wiązania substratu. Dotychczas wykazano, że TIMP-2 wykazuje zdolność do hamowania wszystkich metaloproteinaz, natomiast TIMP-1 hamuje MMP-3 i MMP-9 [2]. Niektóre niespecyficzne inhibitory, jak np. α 2-makroglobulina lub glikoproteina RECK (*reversion-inducing-cysteine-rich protein*), mogą hamować metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 [13, 14].

Wykazano również, że przyłączenie C-końca do domeny hemopeksynowej, np. proMMP-2, prowadzi do jej aktywacji [3]. Niektóre czynniki, m.in. plazmina, trombina, a nawet wzajemne oddziaływanie na siebie różnych MMP, pobudzają nieaktywny proenzym do autokatalizy. Następuje ona skutkiem zerwania wiązania pomiędzy resztą cysteinową a atomem cynku w cząsteczce MMP, wskutek czego enzym zyskuje pełną zdolność katalityczną. Zerwanie wiązania pomiędzy peptydem sygnałowym a atomem cynku jest nazywane „przełączeniem cysteinowym” [15].

Poza omówionymi mechanizmami regulacyjnymi dotyczącymi wszystkich MMP funkcjonują również dodatkowe mechanizmy, które wpływają na aktywność tylko niektórych MMP, jak np.: internalizacja, przechowywanie w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych, kompartmentacja [2].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz są sekrecyjnymi enzymami hamującymi aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Mechanizm hamowania MMP przez TIMP wiąże się z wysokim powinowactwem i zdolnością do niekowalencyjnego ich wiązania się z domeną katalityczną metaloproteinaz. Działanie TIMP ogranicza proteolizę składników ECM, jednakże inhibitory te biorą ponadto udział w regulacji proliferacji, apoptozy oraz angiogenezy. Takie działanie TIMP odbywa się dzięki innym, niezwiązanym z inhibicją MMP, mechanizmom [16]. Dotychczas opisano budowę i działanie czterech rodzajów TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) [17]. Inhibitory różnią się budową i powinowactwem do MMP, a ich ekspresja podlega także różnej regulacji. Większość inhibitorów ma charakter białek rozpuszczalnych (np. TIMP-1, TIMP-2,

TIMP-4), natomiast TIMP-3 jest związana z ECM [18]. Inhibitor TIMP-3, jak dotychczas wykazano, jest głównym inhibitorem metaloproteinaz, jakkolwiek jest odpowiedzialny również np. za inhibicję enzymu konwertującego TNF α , będącego aktywatorem kluczowej cytokiny zapalnej – TNF α [19].

STARZENIE SIĘ I SARKOPENIA

W miarę starzenia się organizmu poważnym problemem zdrowotnym staje się utrata masy ciała [20]. Masa ciała, która 20.–50. r.ż. ulega zwiększeniu, po 65. r.ż. zaczyna stopniowo spadać. Obniżeniu ulega głównie beztłuszczowa masa ciała, w mniejszym stopniu obniża się również zawartość tkanki tłuszczowej. Skutkiem tych zmian zwiększa się odsetek tłuszczu w organizmie (z ok. 15% do 30%), którego lokalizacja zmienia się z podskórnej na okołonarzadową oraz mięśniową. Obniżeniu ulega również podstawowa przemiana materii o 20% u mężczyzn i o 13% u kobiet. Obserwuje się także zmniejszenie łaknienia i poboru pokarmów, a zapotrzebowanie kaloryczne pomiędzy 20. a 80. r.ż. zmniejsza się o 30% [20].

Pojawiające się cechy wyniszczenia organizmu u osób starszych przypisuje się zwykle procesom chorobowym, spośród których najczęstszymi są stany depresyjne, nowotwory, schorzenia przewodu pokarmowego inne niż nowotwór, nadczynność tarczycy, przyczyny jatrogenne i choroby ośrodkowego układu nerwowego. Jednak u ok. ¼ osób, u których doszło do utraty masy ciała, nie udaje się zidentyfikować przyczyny wyniszczenia. Uważa się, że znaczenie mogą mieć tutaj procesy starzenia związane ze spadkiem zapotrzebowania energetycznego, będącego skutkiem zmniejszonej aktywności fizycznej, zmianami w przewodzie pokarmowym powodującymi gorsze wchłanianie i wykorzystanie składników odżywczych, zwolnieniem metabolizmu tkankowego oraz obniżeniem łaknienia [20].

Zmniejszenie aktywności fizycznej i niedożywienie mogą być również jedną z przyczyn sarkopenii, rozumianej jako postępująca z wiekiem utrata mięśni szkieletowych, często związana ze zmniejszeniem siły, szybkości skurczu i mocy mięśni. Ponadto zmiany w układzie nerwowym i hormonalnym, w metabolizmie mięśni, zmniejszenie zdolności proliferacji komórek, związany z wiekiem przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny, przewlekłe stany chorobowe oraz stosowane leki mogą się łączyć z utratą masy mięśniowej, obserwowaną w starszym wieku [21, 22].

Mechanizmy hormonalne i zapalne zaangażowane w ubytek masy mięśniowej postępujący z wiekiem

Z wiekiem obniża się stężenie hormonu wzrostu oraz estrogenów i androgenów. Ponadto obniżona aktywność fizyczna, zwiększenie ilości tkanki tłuszczowej w mięśniach, nasilona synteza adipocytokin (rezystyny, leptyny) oraz działającej prozapalnie IL-6 prowadzą do insulinooporności, która powoduje zmniejszenie syntezy białek w mięśniach szkieletowych. U starych szczurów obserwowano także zmniejszoną wrażliwość na glukokortykoidy, które wywołują proteolizę mięśni

u młodych zwierząt, czego nie zaobserwowano w mięśniach starych szczurów [20, 23, 24].

Wykazano także znaczącą rolę cytokin w utracie masy mięśni wraz z wiekiem [25]. Wiele z nich (przede wszystkim TNF, IL-1, IL-6) może wpływać na procesy naprawcze w mięśniach szkieletowych po ich uszkodzeniu oraz być zaangażowanych w utrzymanie żywotności komórek mięśniowych. Jak wykazano, zwiększone stężenie lub osłabiona wrażliwość na cytokiny mogą prowadzić do spadku masy mięśniowej. Ponadto cytokiny prozapalne mogą wpływać na sarkopenię przez współdziałanie z efektami działania IGF-1.

Oslabienie siły mięśniowej obserwowane w starzejących się mięśniach może, jak wykazano na modelu mysim, być związane ze zmniejszeniem ekspresji kanałów wapniowych wraz z wiekiem [26]. Wykazano ponadto, że ekspresja kanałów potasowych, biorących udział w skurczu mięśni, ale odpowiedzialnych także za biogenezę i proliferację komórek mięśniowych, również ulega obniżeniu. Zmniejszenie ekspresji kanałów jonowych może ponadto zaburzać prawidłowe funkcjonowanie połączeń nerwowo-mięśniowych i również za pomocą tego mechanizmu wpływać na osłabienie siły mięśni [27].

Czynniki nerwowe i mięśniowe starzenia się mięśni

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że najważniejszym czynnikiem prowadzącym do sarkopenii w starzejących się mięśniach jest stopniowa degeneracja układu nerwowego zaopatrującego mięśnie. Głównym czynnikiem jest zanik a-motoneuronów, czego konsekwencją jest upośledzenie strukturalne i funkcjonalne jednostek motorycznych. Zwykle proces ten dotyczy osób po 60. r.ż. [28]. Zakres utraty motoneuronów może być bardzo znaczący. W przypadku motoneuronów pochodzących z krzyżowo-lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego stwierdzono zanik ok. 25% motoneuronów u osób 20.–90. r.ż. Zanikowi motoneuronów towarzyszy postępująca demielinizacja aksonów, co związane jest ze zmniejszeniem liczby i średnicy aksonów unerwiających mięśnie, głównie aksonów o dużej średnicy. Jednocześnie pozostałe nieuszkodzone jednostki motoryczne zwiększają swoją wielkość, zajmując opuszczone miejsce. Prowadzi to do zmniejszenia szybkości przewodzenia we wszystkich włóknach motoneuronów [29].

Z wiekiem maleje również częstotliwość potencjałów czynnościowych we włóknach mięśniowych, co wynikać może ze zmniejszenia pobudliwości błon aksonów lub obniżenia poziomu pobudzenia aktywności nerwowej [30]. W badaniach histologicznych obserwuje się duże zmiany morfologiczne w mięśniach, postępujące wraz z wiekiem, takie jak zmniejszenie średnicy włókien typu II i niewielkie zmiany we włóknach typu I [29], co prowadzi do zmian mechanicznych i trwałego uszkodzenia mięśnia. W późnym wieku, u osób w wieku 80 lat i starszych, stwierdza się zmniejszenie masy obu typów włókien [29].

Przebudowie ulegają także złącza nerwowo-mięśniowe. Zakończenia aksonów kurczą się, co sprawia, że nie łączą się z receptorami. Zmniejsza się pole zakończeń aksonów i wzrasta rozgałęzień końcowych, dochodzi do fragmentacji złącza nerwowo-mięśniowego [31]. W badaniach mikroskopowych

wykazano także, że zmniejszeniu ulega liczba pęcherzyków synaptycznych. Ponadto rozproszeniu ulegają postsynaptyczne receptory dla acetylocholino, a obszar postsynaptyczny powiększa się. Często w starzejących się mięśniach jest również proces odnerwienia mięśni, a następnie ponownego unerwienia (reinerwacji) włókien mięśniowych przez wypustki aksonalne pochodzące z innych, nieuszkodzonych jednostek motorycznych. Odnerwienie i reinerwacja powoduje, że maleje unerwienie ruchowe, co powoduje osłabienie mięśni, często skutkiem unerwiania przez mniejsze motoneurony włókien mięśniowych o dużej szybkości przewodzenia [30].

Z wiekiem maleje również synchronizacja częstotliwości wyładowań podczas skurczu mięśnia co jest skutkiem zmniejszenia liczby wspólnych wejść nerwowych do puli jednostek motorycznych w wyniku atrofii i reinerwacji jednostek motorycznych lub tworzenia nowych synaps. W przypadku gdy reinerwacja włókien mięśniowych nie następuje tak szybko jak odnerwienie, włókna mięśniowe zanikają i są zastępowane przez tkankę tłuszczową i włóknistą, co powoduje spadek masy mięśniowej i atrofię mięśni [22].

Ważnym czynnikiem w rozwoju sarkopenii jest brak aktywności fizycznej. To ona przyczynia się do wzrostu masy mięśniowej, a ćwiczenia wytrzymałościowe – jak wykazano – mogą nawet cofnąć sarkopenię [32].

Zmiany metaboliczne w starzejących się mięśniach

W starzejących się mięśniach obserwuje się zmiany potencjału glikolitycznego i oksydacyjnego mięśni. Potencjał glikolityczny i oksydacyjny decyduje o cechach mechanicznych mięśni, jako że mięśnie o dużej aktywności enzymów oksydacyjnych są bardziej odporne na zmęczenie i charakteryzują się większą wytrzymałością niż mięśnie o niskim potencjale.

Wykazano, że aktywność kluczowych enzymów glikolizy (heksokinazy, dehydrogenazy mleczanowej, kinazy pirogronianowej) w mięśniach szkieletowych obniża się wraz z wiekiem [33]. Aktywność enzymów oksydacyjnych włókien mięśniowych jest związana z ich zdolnością produkcji ATP. Wskaźnikiem względnego potencjału oksydacyjnego w mięśniach szkieletowych jest aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, której aktywność maleje z wiekiem, często aż o 50% [34].

Przyczyną obserwowanych zmian jest zmniejszenie liczby mitochondriów i potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w mięśniach. Wykazano, że spadek zdolności oksydacyjnej mięśni szkieletowych wiąże się ze związanym z wiekiem obniżeniem aktywności ruchowej, ponieważ aktywność fizyczna może zwiększyć aktywność enzymów [35].

Wiele danych wskazuje, że procesowi starzenia się mięśni szkieletowych towarzyszy podwyższone stężenie ROS w mitochondriach. W warunkach fizjologicznych ROS generowane są stale. W stanie spoczynku ich produkcja jest niska, natomiast gwałtownie zwiększa się podczas skurczu, modulując kurczliwość mięśnia [36]. Reaktywne formy tlenu w niskich stężeniach zwiększają natężenie siły skurczu, natomiast w wysokich stężeniach działają hamująco. Przypuszczalnie wpływają na mechanizm kontrolujący przepływ jonów wapniowych

do i z siateczki sarkoplazmatycznej. Wiele danych doświadczalnych wskazuje, że procesowi starzenia się mięśni szkieletowych towarzyszy podwyższone stężenie ROS. Jednocześnie w starszych mięśniach szkieletowych funkcjonowanie antyoksydacyjnego mechanizmu obronnego, jaki tworzą enzymy: katalaza, transferaza glutationowa i dysmutaza ponadtlenkowa, jest osłabione, co przyczynia się do powstawania stresu oksydacyjnego. Dowodem na nasilenie stresu oksydacyjnego w mięśniach szkieletowych jest wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów takich jak lipofuscyna i dialdehyd malonowy [37]. Jednocześnie zaobserwowano, że starzejące się mięśnie są bardziej podatne na działanie ROS [38].

Udział metaloproteinaz w przebudowywaniu macierzy zewnątrzkomórkowej mięśni

Macierz zewnątrzkomórkowa mięśni szkieletowych jest strukturą dynamicznie dostosowującą się do zmiennych warunków towarzyszących wzrostowi lub naprawie tkanki mięśniowej. Głównymi składnikami macierzy w mięśniach szkieletowych są kolagen typu I, III i IV, laminina, tenascyna, fibronektyna, siarczan dermatanu i siarczan heparanu, które stanowią nie tylko składnik strukturalny, ale także biorą udział w adhezji, migracji i fuzji mioblastów. Synteza tych związków jest ściśle regulowana i dostosowana do wymagań etapów regeneracji czy różnicowania komórek mięśniowych.

Uszkodzenie mięśnia powoduje degradację ECM i uwolnienie różnych czynników wzrostu, przy czym struktura ta aktywnie reguluje ich aktywność w tkance, modyfikując wpływ na mioblasty i włókna mięśniowe. Białka krwi, fibryna i fibrynonektyna, w kilka dni po uszkodzeniu mięśnia zaczynają tworzyć nową pierwotną macierz, która stanowi miejsce przyczepu dla napływających fibroblastów. Fibroblasty syntetyzują białka: tenascynę, kolagen typu III i proteoglikany w pierwszej kolejności. Kolejnym syntezowanym białkiem jest kolagen, którego podwyższone stężenie stwierdza się nawet kilka tygodni od powstania uszkodzenia mięśnia. Synteza składników ECM jest niezbędna i korzystna dla procesu regeneracji, wymaga jednak ścisłej regulacji, ponieważ nadmierne ich odkładanie prowadzi do tworzenia się tkanki włóknistej, która otacza włókna mięśniowe [39].

W proces regeneracji lub wzrostu mięśni zaangażowanych jest wiele metaloproteinaz, tj. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-16. Enzymy te, jak wspomniano wcześniej, należą do kolagenaz, żelatynaz, MMP-błonowych i stromielizyn. Kolagenazy degradują kolagen do tropokolagenu, podatnego na działanie niespecyficznych proteaz. Stromielizyny degradują lamininę, fibrynonektynę, elastynę i proteoglikany macierzy zewnątrzkomórkowej otaczające włókna mięśniowe. Metaloproteinazy błonowe dodatkowo aktywują inne MMP, np. MMP-2. Głównymi enzymami degradującymi ECM są żelatynazy MMP-9 i MMP-2, degradujące m.in. zmieniony kolagen [40].

Ekspresja i aktywność żelatynaz w nieuszkodzonych mięśniach jest bardzo niska lub niewykrywalna [41]. Skutkiem stymulacji mechanicznej wzrasta masa i siła mięśnia, wzmocnieniu ulega błona podstawna z powodu zmiany ilości kolagenu

typu IV. Zwiększenie wysiłku prowadzące do drobnych uszkodzeń mięśni powoduje aktywację MMP-9, a następnie MMP-2. Ekspresja MMP-2 wzrasta podczas długotrwałego treningu, natomiast wzrost ekspresji MMP-9 i zwiększenie aktywności enzymu indukowane są skutkiem pojedynczego wysiłku [42].

Podobne zmiany ekspresji MMP-2 i MMP-9 zaobserwowano w pouszkodzeniowej regeneracji mięśni szkieletowych. Stwierdzono także, że niezależnie od sposobu uszkodzenia mięśnia wzrost ekspresji i aktywności enzymów jest podobny. Na etapie miolizy w uszkodzonych mięśniach poziom MMP-9 jest wyższy niż MMP-2, następnie podczas rekonstrukcji ekspresja i aktywność MMP-2 są znacząco wyższe. Zaobserwowano także, że wzrost ekspresji MMP-9 w uszkodzonym mięśniu niesie za sobą wzrost reakcji zapalnej oraz martwicę włókien, a enzym ulega ekspresji przede wszystkim w komórkach stanu zapalnego np. w makrofagach oraz w aktywowanych komórkach satelitarnych.

Na podstawie tych danych można stwierdzić, że zadaniem MMP-9 na etapie miolizy uszkodzonego mięśnia jest degradacja białek ECM oraz ułatwianie proliferacji i migracji mioblastów. Funkcja MMP-2 wiąże się natomiast z przekształcaniem ECM, towarzyszącym powstawaniu nowych włókien w późniejszych etapach regeneracji. Ponadto w późniejszym etapie regeneracji wykazano również zwiększoną aktywność MMP-1, co przyczynia się do przyspieszenia odbudowy tkanki i wzrostu liczby nowych włókien mięśniowych [43, 44].

Należy jednak zaznaczyć, że dojrzałe mięśnie szkieletowe składają się z różnych pod względem morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym rodzajów włókien oraz mogą się różnić poziomem ekspresji i aktywności enzymów z rodziny metaloproteinaz. Taka zmienność, jak wykazano, skutkować może różną reakcją na uszkodzenia, jak np. mięśnie z przewagą włókien wolnych charakteryzuje słaba rekonstrukcja oraz nasilone włóknienie, natomiast mięśnie z przewagą włókien szybkich po uszkodzeniu rekonstruują się i znacznie szybciej wykazują prawidłową strukturę [41].

Aktywność metaloproteinaz w stanach patologicznych i starzejących się mięśniach

Wielu stanom chorobowym mięśni towarzyszy wzrost ekspresji i aktywności metaloproteinaz. W badaniach poświęconych miopatiom mięśniowym w przebiegu choroby zaobserwowano powtarzające się cykle degradacji i regeneracji tkanki mięśniowej, z towarzyszącą tym procesom nadmierną kumulacją składników ECM. U chorych z miopatią w badaniach histopatologicznych obserwuje się liczne śródmiąższowe i okołonaczyniowe nacieki zapalne, zanik włókien mięśniowych i martwicę. Procesom tym towarzyszy niewielka regeneracja tkanki, z małą ilością nowych włókien mięśniowych. Wykazano, że w wielu miopatiach ekspresja MMP-9, MMP-2, MMP-1 i MMP-7 ulega znaczącemu podwyższeniu [45].

Zaburzenia ekspresji metaloproteinaz stwierdzono również w badaniach przeprowadzonych u chorych z dystrofią mięśniową Duchenne'a oraz na zwierzęcych modelach dystrofii mięśniowej u myszy i psów. Mięśnie dystroficzne zarówno w przypadku człowieka, jak i zwierząt charakteryzował

nieprawidłowy układ włókien oraz nadmierna ilość białek macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim kolagenu i fibrynonektyny, której ilość wzrastała z wiekiem [46]. Analiza ekspresji metaloproteinazy MMP-9 w mięśniach myszy i psów z dystrofią wykazała znaczący wzrost w degenerujących mięśniach oraz wzrost syntezy MMP-2 podczas ich regeneracji. Wzrostowi ekspresji metaloproteinaz towarzyszyła nasilona reakcja zapalna [46, 47]. W innych badaniach w dystroficznych mięśniach zaobserwowano również wzrost ekspresji MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-12, MT1-MMP oraz obniżenie ekspresji MMP-11, zanotowane wraz z postępem choroby [46, 48]. Badania te dostarczyły cennych danych, jednakże rola metaloproteinaz w tych schorzeniach nie została jeszcze wystarczająco wyjaśniona i wymaga prowadzenia dalszych badań.

Wiadomo, że regeneracja dojrzałych mięśni zachodzi dzięki aktywacji niezróżnicowanych komórek satelitowych. Aktywacja tych komórek, a następnie ich różnicowanie w mioblasty, migracja, proliferacja oraz fuzja prowadząca do powstania wielojądrowego włókna mięśniowego są związane z syntezą, degradacją białek ECM oraz jej strukturalnymi zmianami. Wydaje się, że na każdym z tych etapów rola metaloproteinaz może być znacząca. Dla przykładu MMP-1 ułatwia migrację mioblastów, prawdopodobnie przez indukcję pre-MMP-2 odpowiedzialnej za proteolizę zdegradowanego kolagenu [49]. Zwiększona ekspresja MMP-2 i MMP-7 wydłuża dystans migracji mioblastów [50]. Natomiast wyciszenie ekspresji genu MMP-3 obniża szybkość migracji mioblastów [51].

Wykazano także, że metaloproteinazy są zaangażowane w fuzję mioblastów, np. mysie mioblasty linii C2C12, w których zaobserwowano podwyższoną ekspresję MMP-2/MT1-MMP, wytworzyły większe miotuby w porównaniu z komórkami o niższej ekspresji metaloproteinaz [52]. Również dodanie do hodowli mioblastów inhibitorów metaloproteinaz TIMP-9, TIMP-2 lub TIMP-3 spowodowało zahamowanie tworzenia miotub [53].

Starzenie się jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób serca. U pacjentów w podeszłym wieku wyniki leczenia ostrych epizodów sercowo-naczyniowych są często niezadowolające. Starzenie się jest związane ze zmianami dotyczącymi mechanizmów homeostatycznych, co zwiększa podatność naczyń krwionośnych na uszkodzenia. Jak wykazano, u człowieka wraz z wiekiem może dochodzić do upośledzenia funkcji rozkurczowej serca, niezależnie od chorób współistniejących, np. nadciśnienia tętniczego, cukrzycy [54]. U myszy starzenie się jest skojarzone z niewielkim, ale o istotnym skutku, upośledzeniem funkcji lewej komory serca (*left ventricle* – LV) [55]. Jak wykazano, nieprawidłowości pracy lewej komory wynikają również z upośledzenia jej funkcji rozkurczowej, natomiast funkcja skurczowa pozostaje relatywnie niezmieniona. Pozakomórkowa macierz mięśnia sercowego reguluje właściwości rozkurczowe LV, wzmacnia strukturę miokardium i zawiera czynniki wpływające na homeostazę, m.in. czynniki wzrostu.

Wykazano, że MMP-9 degradowe szerokie spektrum składników macierzy, cytokin oraz czynników wzrostu. Metaloproteinaza MMP-9 odgrywa także kluczową rolę w procesie

przebudowy (remodelingu) LV, przyczynia się do dylatacji LV i nadmiernej akumulacji kolagenu zarówno w starzejącym się sercu, jak i po przebytych zawale serca [54]. W badaniach prowadzonych na starych myszach zaobserwowano dwukrotny wzrost ekspresji genu *MMP-9* u myszy w wieku 15–18 miesięcy w porównaniu z tymi w wieku 6–9 miesięcy. Zaobserwowano również wzrost ekspresji białka *MMP-9* wraz z wiekiem gryzonia oraz nacieczenia makrofagów w lewej komorze serca, co może prowadzić do rozwinęcia się jej dysfunkcji. Wyłączenie *MMP-9* przez zablokowanie ekspresji w cytowanych badaniach skutkowało zwiększeniem angiogenezy, hamowało proces zapalny i zapobiegło uszkodzeniom naczyń w starzejącym się sercu badanych myszy [55]. W innych badaniach prowadzonych na starzejących się myszach wykazano, że również *MMP-9* ulegająca sekrecji przez makrofagi wpływa znacząco na powiększenie lewej komory [56].

Guzzoni i wsp. [57] po raz pierwszy zaobserwowali korzystny wpływ treningu na zmniejszenie gromadzenia kolagenu i włóknienie mięśnia sercowego u starych szczurów. W badaniach tych wykazano ponadto spadek ekspresji genów kolagenu typu I, *TGF-β1* i *TIMP-1* i aktywności *MMP-2*.

Wright i wsp. [58] potwierdzili korzystny wpływ wysiłku fizycznego na zmniejszenie zwłóknienia mięśnia sercowego u starych szczurów. Trening obniżał również stężenie końcowych produktów glikacji białek (*advanced glycation end-product*) w mięśniu sercowym zwierząt, natomiast nie miał istotnego wpływu na ekspresję *MMP-1* i *TIMP-1*. Kwak i wsp. [59] wykazali u starych szczurów obniżenie ekspresji *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-14* oraz zwiększenie ekspresji *TIMP-1* we frakcji ECM lewej komory serca. Trening szczurów obniżył istotnie ekspresję badanych *MMP* i wpłynął na zwiększenie ekspresji *TIMP*. Również zwiększone z wiekiem stężenie *TGF-β* (będącego regulatorem ekspresji *TIMP*) uległo obniżeniu u trenowanych starych szczurów. Autorzy pracy stwierdzili, że aktywność fizyczna może być czynnikiem chroniącym starzejący się mięsień sercowy przed dysregulacją aktywności *MMP* i zwłóknieniem mięśnia sercowego. Kim i Yi [60] potwierdzili korzystny wpływ treningu również na mięśnie szkieletowe obserwując spadek ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (*iNOS*) i cyklooksygenazy 2 (*COX 2*), bez zmian w ekspresji i aktywności *MMP-2*.

PODSUMOWANIE

Starzenie się organizmu pociąga za sobą zmiany morfologiczne, metaboliczne i czynnościowe w mięśniach. Zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstawy tych zmian, jak również zmian wynikających ze zmniejszonej aktywności fizycznej w zaawansowanym wieku może istotnie opóźnić lub zmniejszyć efekty starzenia się mięśni, szczególnie szkieletowych i mięśnia sercowego. Metaloproteinazy, biorące z jednej strony udział w procesach regeneracji tkanki mięśniowej, z drugiej uczestniczące w rozwoju reakcji zapalnej, mogą stanowić cel postępowania leczniczo-rehabilitacyjnego u osób starszych.

PIŚMIENNICTWO

- Jung P, Zimowska M. Matrix metalloproteinase in development, physiology and degenerative processes of skeletal muscles. *Postepy Biochem* 2016;62(1):25-35.
- Yong VW. Metalloproteinases: Mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(12):931-44. doi: 10.1038/nrn1807.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- Aureli L, Gioia M, Cerbara I, Monaco S, Fasciglione GF, Marini S, et al. Structural bases for substrate and inhibitor recognition by matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2008;15(22):2192-222.
- Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol* 2015;44-46:207-23. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.004.
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003;3(6):589-601.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 2001;276(47):43503-8. doi: 10.1074/jbc.M107736200.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(3):221-33. doi: 10.1038/nrm2125.
- Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284(4):805-15. doi: 10.1152/ajp-cell.00215.2002.
- Rullman E, Norrbon J, Strömberg A, Wågsäter D, Rundqvist H, Haas T, et al. Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2009;106(3):804-12. doi: 10.1152/jappphysiol.90872.2008.
- Piperi C, Papavassiliou A. Molecular mechanisms regulating matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 2012;12(10):1095-112.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-27.
- Alexius-Lindgren M, Andersson E, Lindstedt I, Engström W. The RECK gene and biological malignancy – its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. *Anticancer Res* 2014;34(8):3867-73.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010;20(3):161-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.05.002.
- Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 2002;22(1):51-86. doi: 10.1385/MB:22:1:051.
- Mannello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 2001;6(6):479-82.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metast* 2000;18(2):111-20.
- Amour A, Slocumbe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, et al. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 1998;435(1):39-44.
- Evans WJ. Protein nutrition, exercise and aging. *J Am Coll Nutr* 2004;23(6):601-9.
- Budzińska K. Wpływ starzenia się organizmu na biologię mięśni szkieletowych. *Gerontol Pol* 2006;13(1):1-7.
- Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003;95(4):1717-27. doi: 10.1152/jappphysiol.00347.2003.
- Dardevet D, Sornet C, Savary I, Debras D, Patureau-Mirand P, Grizard J. Glucocorticoid effects on insulin- and IGF-I-regulated muscle protein metabolism during aging. *J Endocrinol* 1998;156(1):83-9.

24. Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D, Grizard D. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J Clin Invest* 1995;96(5):2113-9. doi: 10.1172/JCI118264.
25. Morley JE. Anorexia, sarcopenia, and aging. *Nutrition* 2001;17:660-3.
26. Delbono O. Regulation of excitation contraction coupling by insulin-like growth factor-1 in aging skeletal muscle. *J Nutr Health Aging* 2000;4(3):162-4.
27. Badawi Y, Nishimune H. Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging. *Neurosci Res* 2017;127:78-88. doi: 10.1016/j.neures.2017.11.014.
28. Lexell J. Evidence for nervous system degeneration with advancing age. *Nutr* 1997;127(5):1011-3.
29. Doherty TJ, Vandervoort AA, Brown WF. Effects of ageing on the motor unit: A brief review. *Can J Appl Physiol* 1993;18(4):331-58.
30. Erim Z, Beg MF, Burke DT, de Luca CJ. Effects of aging on motor-unit control properties. *J Neurophysiol* 1999;82(5):2081-91. doi: 10.1152/jn.1999.82.5.2081.
31. Prakash YS, Sieck GC. Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers. *Muscle Nerve* 1998;21:887-95.
32. Evans WJ. Effects of exercise on senescent muscle. *Clin Orthop Relat Res* 2002;403:211-20.
33. Pastoris O, Boschi F, Verri M, Baiardi P, Felzani G, Vecchiet J, et al. The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp Gerontol* 2000;35(1):95-104.
34. Oliven A, Carmi N, Coleman R, Odeh M, Silbermann M. Age-related changes in upper airway muscles morphological and oxidative properties. *Exp Gerontol* 2001;36(10):1673-86.
35. Powers SK, Lawler J, Criswell D, Dodd S, Silverman H. Age-related changes in enzyme activity in the rat diaphragm. *Respir Physiol* 1991;83(1):1-9.
36. Reid MB. Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: What we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001;90(2):724-31. doi: 10.1152/jappl.2001.90.2.724.
37. Fulle S, Protasi F, Di Tano G, Pietrangelo T, Beltrami A, Boncompagni S, et al. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol* 2004;39(1):17-24.
38. Ji LL. Exercise at old age: Does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:236-247.
39. Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000;11(2):251-66.
40. Alameddine HS. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: Friends or foes? *Neurobiol Dis* 2012;48(3):508-18. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.023.
41. Zimowska M, Brzoska E, Świerczyńska M, Stremińska W, Moraczewski J. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int J Dev Biol* 2008;52(2-3):307-14. doi: 10.1387/ijdb.072331mz.
42. Rullman E, Rundqvist H, Wågsäter D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, et al. A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2007;102(6):2346-51. doi: 10.1152/japplphysiol.00822.2006.
43. Kaar JL, Li Y, Blair HC, Asche G, Koepsel RR, Huard J, et al. Matrix metalloproteinase-1 treatment of muscle fibrosis. *Acta Biomater* 2008;4(5):1411-20. doi: 10.1016/j.actbio.2008.03.010.
44. Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdière-Sahuqué M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: A study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 1999;205(1):158-70. doi: 10.1006/dbio.1998.9107.
45. Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, Gearing AJ, Gold R, Toyka KV, et al. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 2001;124(2):341-51.
46. Bani C, Lagrota-Candido J, Pinheiro DF, Leite PE, Salimena MC, Henriques-Pons A, et al. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 2008;37(5):583-92. doi: 10.1002/mus.20970.
47. Fukushima K, Nakamura A, Ueda H, Yuasa K, Yoshida K, Takeda S, et al. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet Disord* 2007;8:54. doi: 10.1186/1471-2474-8-54.
48. Zanutti S, Gibertini S, Mora M. Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts before and after TGF-beta1 treatment. *Cell Tissue Res* 2010;339(2):397-410. doi: 10.1007/s00441-009-0889-4.
49. Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr* 2009;3(4):337-41.
50. Fahime E, Torrente Y, Caron NJ, Bresolin MD, Tremblay JP. In vitro migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res* 2000;258(2): 279-87. doi: 10.1006/excr.2000.4962.
51. Nishimura T, Nakamura K, Kishioka Y, Kato-Mori Y, Wakamatsu J, Hattori A. Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 2008;29(1):37-44. doi: 10.1007/s10974-008-9140-2.
52. Caron NJ, Asselin I, Morel G, Tremblay JP. Increased myogenic potential and fusion of matrilysin-expressing myoblasts transplanted in mice. *Cell Transplant* 1999;8(5):465-76.
53. Ohtake Y, Tojo H, Seiki M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J Cell Sci* 2006;119(18):3822-32. doi: 10.1242/jcs.03158.
54. Szychta W. Metalloproteinazy jako wskaźniki pozawałowej przebudowy mięśnia lewej komory serca. *Kardiologia* 2010;9(12):52-6.
55. Yabluchanskiy A, Ma Y, Chiao YA, Lopez EF, Voorhees AP, Toba H, et al. Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9-mediated endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306(10):1398-407. doi: 10.1152/ajpheart.00090.2014.
56. Toba H, Cannon PL, Yabluchanskiy A, Iyer RP, D'Armiento J, Lindsey ML. Transgenic overexpression of macrophage matrix metalloproteinase-9 exacerbates age-related cardiac hypertrophy, vessel rarefaction, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;312(3):H375-83. doi: 10.1152/ajpheart.00633.2016.
57. Guzzoni V, Marqueti RC, Durigan JLQ, Faustino de Carvalho H, Lino RLB, Mekaro MS, et al. Reduced collagen accumulation and augmented MMP-2 activity in left ventricle of old rats submitted to high-intensity resistance training. *J Appl Physiol* (1985) 2017;123(3):655-63. doi: 10.1152/japplphysiol.01090.2016.
58. Wright KJ, Thomas MM, Betik AC, Belk D, Hepple RT. Exercise training initiated in late middle age attenuates cardiac fibrosis and advanced glycation end-product accumulation in senescent rats. *Exp Gerontol* 2014;50:9-18. doi: 10.1016/j.exger.2013.11.006.
59. Kwak HB, Kim JH, Joshi K, Yeh A, Martinez DA, Lawler JM. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. *FASEB J* 2011;25(3):1106-17. doi: 10.1096/fj.10-172924.
60. Kim JS, Yi HK. Intermittent bout exercise training down-regulates age-associated inflammation in skeletal muscles. *Exp Gerontol* 2015;72:261-8. doi: 10.1016/j.exger.2015.11.001.