

Univerzita Karlova v Praze

Prírodovedecká fakulta

Biológia



Zuzana Paračková

Metaloproteinázy medzibunkovej matrix v prednom očnom segmente

Matrix metalloproteinases in anterior eye segment

Bakalárska práca

Školiteľ: MuDr. Taras Ardan Ph.D.

Praha, 2011

Ďakujem svojmu školiteľovi MuDr. Tarasovi Ardanovi PhD. za konzultácie a trpezlivosť. Zároveň sa chcem poďakovať Petre Rakovskej za to, že bola pri mne v ťažkých chvíľach.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu napísala samostatne a že som uviedla všetky použité zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť neboli predložené k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 8.5.2011

Podpis:

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Abstract.....	4
3. Úvod.....	5
4. Metaloproteinázy medzibunkovej matrix.....	6
4.1 Obecné štruktúrne rysy metaloproteináz medzibunkovej matrix.....	6
4.2 Aktivácia matrix metaloproteináz.....	8
4.3 Endogénne inhibítory matrix metaloproteináz.....	9
4.4 Klasifikácia metaloproteináz medzibunkovej matrix.....	11
4.4.1 Kolagenázy.....	11
4.4.2 Želatinázy.....	11
4.4.3 Stromelysiny.....	11
4.4.4 Matrilysiny.....	12
4.4.5 Na membránu viazané matrix metaloproteinázy.....	12
4.4.6 Ostatné metaloproteinázy medzibunkovej matrix	12
5. Metaloproteinázy medzibunkovej matrix v prednom očnéom segmente.....	15
5.1 Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v rohovke.....	16
5.1.1 Stavba rohovky.....	16
5.1.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v rohovke.....	17
5.2 Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v šošovke.....	23
5.2.1 Stavba šošovky.....	23
5.2.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v šošovke.....	23
5.3 Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v dúhovke.....	25
5.3.1 Stavba dúhovky.....	25
5.3.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v dúhovke	25
6. Záver.....	26
7. Zoznam použitej literatúry.....	27

1. Abstrakt

Metaloproteinázy medzibunkovej matrix patria ke skupine proteáz, ktoré v normálnom tkanive sú zodpovedné za degradáciu a remodeláciu jednotlivých komponent medzibunkovej matrix a ich aktivita je regulovaná endogénnymi inhibítormi. Avšak mnohé patologické stavy predného očného segmentu sú charakterizované zvýšenou aktivitou metaloproteináz medzibunkovej matrix a naopak zníženou aktivitou ich tkanivových inhibítorov. Nerovnováha medzi metaloproteinázami medzibunkovej matrix a ich inhibítormi môže viesť k deštruktívnemu proteolytickému poškodeniu tkaniva predného segmentu oka, vrátane straty zraku.

Kľúčové slova: metaloproteinázy medzibunkovej matrix, tkanivové inhibítory metaloproteináz medzibunkovej matrix, extracelulárna matrix

2. Abstract

Matrix metalloproteinases belong to the group of proteases which in normal tissue are responsible for degradation and remodeling of extracellular matrix components and their activity is regulated by endogenous inhibitors. However, many pathological conditions of the anterior eye segment are characterized by increased activity of matrix metalloproteinases and conversely decreased activity of their tissue inhibitors. The imbalance between matrix metalloproteinases and their inhibitors can lead to destructive proteolytic tissue damage anterior eye segment, including blindness.

Key words: matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, extracellular matrix

3. Úvod

Dôležitosť zraku si často uvedomujeme až keď ho strácame. Mnoho patológií je spojených s poruchou extracelulárnej matrix. Je to systém veľmi dynamický, kde nové komponenty sú rýchlo syntetizované, upravované, štiepené a odbúrávané. Na tomto obrate jednotlivých zložiek sa významne podieľajú metaloproteinázy medzibunkovej matrix, nazývané aj matrixiny. V ľudskej DNA bolo objavených 24 génov pre túto rodinu proteínov, ktorých význam v posledných desaťročiach narastá kvôli nezanedbateľnej role, ktorú hrajú v mnohých tumorových, neurodegeneratívnych, imunitných či kardiovaskulárnych ochoreniach. Táto práca sa venuje ich významu v prednom očnom segmente, kde v malom množstve a v rovnováhe so svojím inhibítormi sa podieľajú na zachovávaní fyziologického stavu a vizuálnej funkcii oka. Taktiež sa významne podieľajú v procesoch hojenia. Očný povrch je denne vystavovaný mnohým nepriaznivým vplyvom prostredia, a preto nie je prekvapujúce, že táto rovnováha býva porušenou najčastejšie v prospech proteináz, kde ich deregulovanou činnosťou dochádza k nežiaducim procesom, ako sú poruchy bunkového cyklu, diferenciácie, migrácie, neovaskularizácie, zápal, apoptóza a mnohé ďalšie. Avšak metaloproteinázy medzibunkovej matrix nemajú len deštruktívnu úlohu sprevádzanú zvýšenou expresiou, pretože sa podieľajú na re-epitelizácii po poškodení. Mnoho súčasných štúdií sa venuje skúmaniu molekulárnych mechanizmov, ktoré vedú k aktivácii či naopak inhibícii týchto enzýmov a ich inhibítorov a hľadajú sa ich alternatívy v terapeutickom využití, či už pri jednotlivých ochoreniach alebo operáciách zraku.

V prvej časti sa venujem všeobecnej charakteristike matrix metaloproteináz, ich aktivácii, inhibícii a klasifikácii. V druhej časti sa podrobne venujem jednotlivým častiam predného segmentu oka a úlohe, ktorú tu majú tieto proteázy, či už ide o negatívnu rolu v patologických procesoch alebo pozitívnu pri hojení. Rohovke, keďže je v priamom kontakte s vonkajším prostredím a hlavne denne vystavená dávkam UV žiarenia, voči ktorému je najcitlivejšia, sa venuje podstatnejšie množstvo štúdií, preto je aj v tejto práci problematike matrix metaloproteináz v rohovke venovaný väčší priestor ako v šošovke a dúhovke.

4. Metaloproteinázy medzibunkovej matrix

Prvý objav týkajúci sa matrixových metaloproteináz (MMP- matrix metalloproteinase) bol uskutočnený v roku 1962, keď Jerome Gross a Charles M. Lapiere študovali kolagenázovú aktivitu pri metamorfóze chvosta u žubrienky, kde dochádzalo k degradácii trojvláknového kolagénu, ktorý má helikálnu štruktúru (Gross and Lapiere, 1962). Degradácia bola možná pomocou enzýmu, ktorý bol pomenovaný ako intersticiálna kolagenáza (MMP1).

Neskôr, v roku 1968 bol prvýkrát izolovaný z ľudskej kože (Eisen et al., 1968) ako zymogen (neaktívna forma) (Harper et al., 1971).

Až v roku 1990 sa zistilo, že k tomu, aby nedochádzalo k štiepeniu substrátu predčasne, je zodpovedný mechanizmus cysteinového zopnutia (v anglickej literatúre vyskytujúce sa pod názvom „Cystein switch“) (Vanwart and Birkedalhansen, 1990).

Matrixové metaloproteinázy sú početnou skupinou zinok – dependentných proteínov, známe schopnosťou štiepiť a remodelovať jednotlivé komponenty spojivového tkaniva rovnako ako aj proteíny nematrixovej povahy za rôznych fyziologických aj patologických stavoch (Fini et al., 1992).

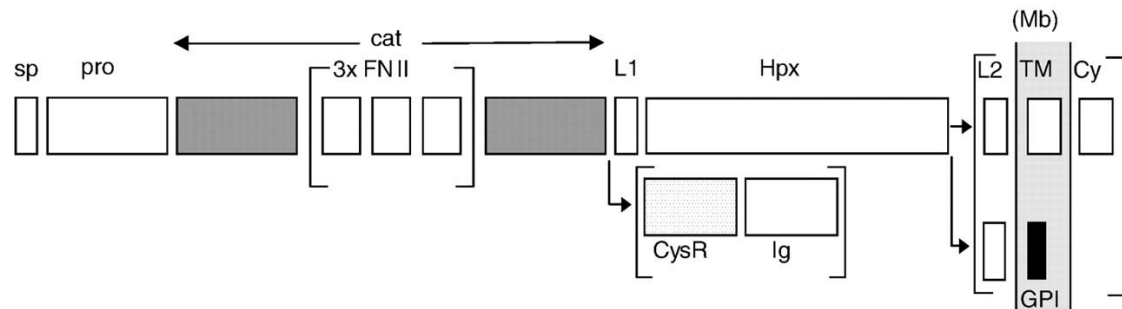
Matrixové metaloproteinázy sú charakterizované ako matrix degradujúce proteázy, avšak tieto enzýmy nielen, že dokážu degradovať komponenty extracelulárnej matrix, ale aj ovplyvňujú mnohé dôležité procesy ako delenie, diferenciáciu, migráciu a smrť buniek rovnako ako aj interakcie medzi bunkami. Z tohto dôvodu nie je prekvapujúce, že MMP majú rozhodujúcu rolu v mnohých fyziologických procesoch, ako napríklad morfogénzia kosti, menštruačný cyklus, angiogénzia, embryonálny vývoj, nervový rast, hojenie rán a samozrejme za patologických podmienok ako je rakovinové bujnenie, artritída, cievne choroby, cirhóza, gastrický vred alebo arteroskleróza. V súčasnosti narastajúci počet štúdií odhaľuje ďalšie substráty nematrixovej povahy pre MMP. Sú zapojené v procese štiepenia povrchových receptorov, uvoľneniu apoptických ligandov (ako FAS ligand) a aktivácii a deaktivácii cytokínov a chemokínov, čo indikuje, že tieto metaloproteinázy majú širšie pole pôsobenia vo fyziologických aj patologických procesoch (McCawley and Matrisian, 2001).

4.1 Obecné štrukturálne rysy metaloproteináz medzibunkovej matrix

Matrix metaloproteinázy sú extracelulárne proteíny, ale súčasné štúdie ukazujú, že MMP-1 (Limb et al., 2005), MMP-2 (Kwan et al., 2004) a MMP-11 (Luo et al., 2002) sa taktiež nachádzajú intracelulárne a môžu pôsobiť na intracelulárne proteíny.

Samotná štruktúra proenzýmu sa člení do troch základných domén: N-terminálneho propeptidu, katalytickej domény a C- terminálnej časti molekuly, ktorá vykazuje štruktúru hemopexínovej rodiny proteínov. (Obr.1)

Obr. 1 Doménová štruktúra MMP



Nagase H et al. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573

Doménová štruktúra rodiny MMP: sp- signálna sekvencia, pro- pro- doména, cat – katalytická doména, FNII – motív fibronektin II. typu, L1 – linker1 (spája katalytickú a hemopexínovú doménu), Hpx – hemopexínová doména, L2 – linker 2, Mb- plazmatická membrána, TM- transmembránová doména, Cy- cytoplazmatická časť, CysR – cystein bohatá oblasť, Ig – imunoglobulínová doména, GPI – glykosylfosfatidylinositolová kotva (Nagase et al., 2006)

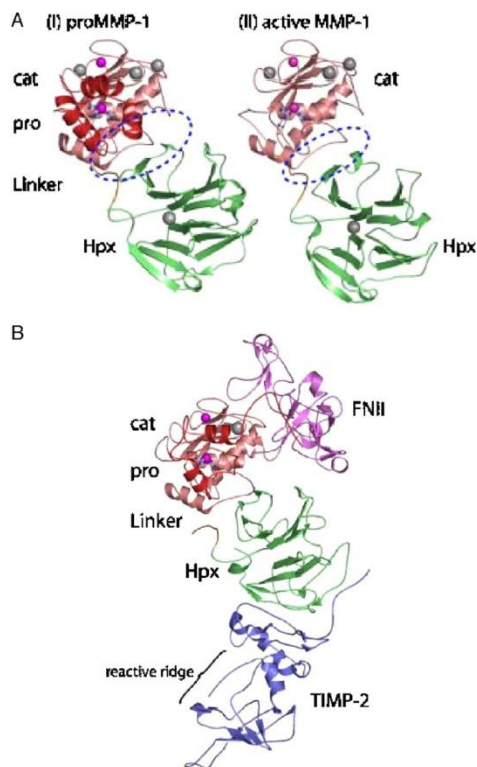
Propeptid obsahuje približne 80- 90 aminokyselín obsahujúcich cysteínový zvyšok, ktorý interaguje s katalytickým atómom Zn^{2+} cez thiolovú skupinu a utvára tak cysteínové zopnutie, tým je zaručená latencia enzýmu (Vanwart and Birkedalhansen, 1990).

Katalytická doména obsahuje dva zinkové ióny a minimálne jeden vápenatý. Prvý Zn^{2+} je prítomný v aktívnom mieste a je esenciálny pre proteolytickú aktivitu MMP (Bode et al., 1994; Salowe et al., 1992).

C-terminálna doména je vysoko konzervovaná a vykazuje štruktúrnu podobu s proteínmi tzv. hemopexínovej rodiny (proteíny nachádzajúce sa v séru). Má relatívne veľký povrch pre prípadne interakcie s inými proteínmi (GomisRuth et al., 1996).

Hemopexínová doména je dôležitá a charakteristická aj pre kolagenázy, ktoré štiepia trojzátvicu intersticiálneho kolagénu. Táto doména vykazuje u nich proteolytickú aktivitu aj k iným substrátom (Bode, 1995). Matrilysiny (MMP-7, MMP-26) naopak túto doménu nemajú. U skupiny transmembránových matrixových metaloproteináz (MT - MMP) je navyše prítomná aj transmembránová doména, ktorá viaže enzým k povrchu bunky. Túto doménu tvorí hydrofóbny reťazec s približne 25 aminokyselinami. Výnimkou sú MT4-MMP a MT6-MMP, ktoré sú k povrchu bunky pripevnené GPI kotvou (Nagase and Woessner, 1999).

Obr.2 Diagram ľudskej proMMP1 a MMP1.



Nagase H et al. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573

Diagram ľudskej pro-MMP-1 a aktivovanej prasacej MMP-1: prodoména je vyznačená červene, katalytická je ružová, linker je žltý, hemopexínová doména je zelená, ión Zn je fialový a Ca je sivý. Bodkovaný kruh naznačuje, kde katalytická a hemopexínová doména interagujú. proMMP-1 má širšiu oblasť kontaktných miest ako MMP-1. Z toho vyplýva, že aktívna forma na „otvorenú“ konfiguráciu v porovnaní s „uzavretou“ konfiguráciou neaktívnej formy. Predpokladá sa, že toto je oblasť kam sa viaže kolagén. V B- obrázku je modrou znázornený TIMP-2 (Nagase et al., 2006)

4.2 Aktivácia matrix metaloproteináz

MMP sú syntetizované ako pre-proenzymy. Signálny peptid (Obr.1) je odstránený v priebehu translácie a tak vznikajú proMMP. Aktivácia tohto zymogenu je podstatným krokom v regulácii aktivity metaloproteináz medzibunkovej matrix.

Trinášť MMP (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -18, -19, -20, -26, -27) (Nagase et al., 2006) sú sekretované von z bunky ako proMMP. Prítomnosť citlivého regiónu na propeptide umožňuje tkanivovým a plazmatickým, prípadne bakteriálnym proteázam aktivovať proMMP. Odštiepením tejto oblasti sa oddelí len časť molekuly. Kompletne oddelenie propeptidu je často riadené MMP intermediátom alebo už aktivovanou metaloproteinázou. Tento mechanizmus sa nazýva postupná aktivácia („stepwise activation“) (Nagase et al., 1990)

Desať proMMP (MMP-11, -14, -15, -16, -17, -21, -23, -24, -25, -28) (Nagase et al., 2006) majú furín-rozoznávajúcu sekvenciu RX[K/R]R na konci propeptidu a vďaka tomu sú aktivované intracelulárne a na povrch bunky sekretované už ako aktívne enzýmy. Aktivita týchto metaloproteináz matrixovej matrix je regulovaná špecifickou lokalizáciou v tkanivách, endogénnymi inhibítormi, prípadne proteolýzou (Nagase et al., 2006). V prípade MT1-MMP, regulácia funguje na úrovni endocytózy. MT1-MMP je rýchlo endocytovaná a čiastočne exprimovaná na povrch bunky (Remacle et al., 2003).

Ďalšou vlastnosťou MMP je, že mnohé z nich sa ľahko aktivujú ortuťovými zlúčeninami, SH reagentmi a chaotropnými agens, pravdepodobne kvôli rozrušeniu molekuly. Táto vlastnosť sa využíva k aktivácii proMMP v laboratóriách. Na strane druhej, oxidačné činidla ako HOCl a ONNO⁻ aktivujú proMMP tým, že reagujú s cysteínom v cysteínovom zopnutí v propeptide. Tento spôsob aktivácie má svoju rolu v zápalových stavoch (Gu et al., 2002; Peppin and Weiss, 1986).

4.3 Endogénne inhibítory matrix metaloproteináz

Aktivita MMP je regulovaná dvoma typmi endogénnych inhibítorov: α 2-makroglobulin a TIMP (tkanivové inhibítory matrix metaloproteináz).

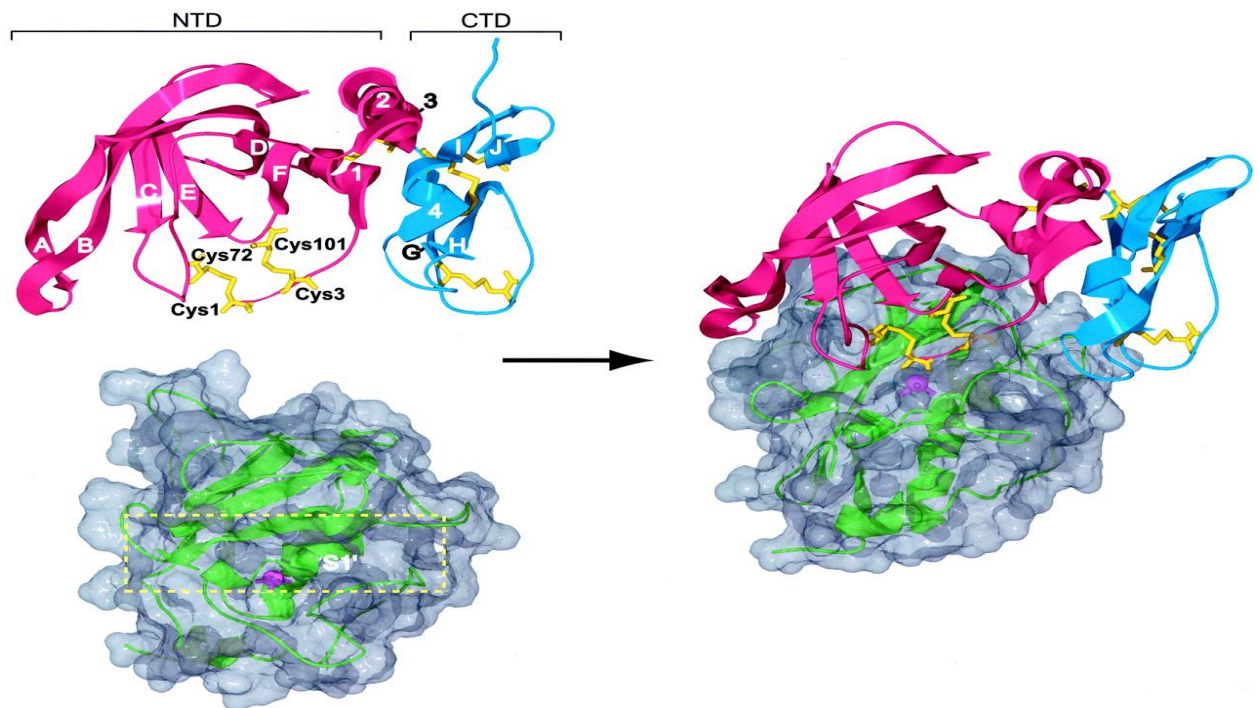
Ľudský α 2-makroglobulin je plazmový glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 725 kDa. Inhibuje väčšinu proteínáz, spojením proteínu s makroglobulínom do komplexu, naviazaním na receptor (low density lipoprotein receptor – spojeným proteínom1) a endocytovaním (Strickland et al., 1990).

Tkanivové inhibítory matrixových metaloproteináz (TIMP) sú hlavné endogénne regulátory MMP v tkanivách. Boli popísané štyri homológne molekuly, označované ako TIMP-1, -2, -3, -4. Väčšinou sa viažu na MMP v pomere 1:1, tvoria binárne nekonvalentné komplexy (Obr.3). Blokujú tak väzbové miesta pre štiepené substráty (Murphy, 1995).

Takmer všetky TIMP-y inhibujú všetky MMP, no líšia sa afinitou. Príkladom je TIMP-1, ktorý je slabým inhibítorom pre MT1-, MT3-, MT5-MMP a MMP-19 (Baker et al., 2002).

Všetky TIMP-y majú NH₂ doménu, o ktorej sa predpokladá, že je esenciálna pre väzbu a inhibíciu MMP. TIMP-1 a TIMP-2 majú tvar klinu, ktorý zapadá do aktívneho miesta matrix metaloproteináz ako molekula substrátu (Woessner, 1991). Konzervovaný cysteínový zvyšok na N-terminálnom konci následne kontaktuje atóm zinku v aktívnom mieste a za vylúčenia molekuly vody inaktivuje MMP (GomisRuth et al., 1997).

Obr. 3 Štruktúra TIMP-2 a komplex TIMP-MT1-MMP



Vise, R. et al. *Čirč Res* 2003;92:827-839

Štruktúra TIMP: ružovou je znázornená N- terminálna doména, modrou C- terminálna doména a žltou disulfidické väzby.

Inhibícia nie je jedinou vlastnosťou, ktorú tieto tkanivové inhibítory majú. Niektoré štúdie poukazujú na spoluúčasť TIMP- 2 v aktivácii proMMP-2 (Imai et al., 1996; Strongin et al., 1995; Zhao et al., 2004). TIMP-1 a -2 boli identifikované ako potenciálne rastové faktory pre širokú škálu buniek (Hayakawa et al., 1992). O TIMP-1 sa uvažuje ako o indikátore skorého štádia rakoviny prsníka pre jeho mitogénny efekt na tieto bunky (Luparello et al., 1999). Taktiež sú TIMP-y spojované aj s ich úlohou pri apoptóze. TIMP-1 u epitelových buniek prsníka a B- lymfocytov potláča apoptózu, zatiaľ čo TIMP-2 má opačný efekt (Guedez et al., 1998; Li et al., 1999). Naopak, TIMP-2 potláča apoptózu u melanómov (Valente et al., 1998).

Všetky tieto štúdie dokazujú aký široký rozsah účinku TIMP-y majú. Spolu s MMP sa podieľajú v remodelačných procesoch v tkanivách. Rovnováha medzi kolagenázami a ich inhibítormi je veľmi dôležitá pre remodeláciu tkaniva, narušenie tejto rovnováhy môže významne zmeniť jeho funkčné charakteristiky (Ponton et al., 1991).

4.4 Klasifikácia metaloproteináz medzibunkovej matrix

Podľa domén a preferovaných substrátov sa metaloproteinázy medzibunkovej matrix delia na niekoľko skupín: kolagenázy, želatinázy, stromelysiny, matrilysiny, na membránu viazané a ostatné metaloproteinázy medzibunkovej matrix.

4.4.1 Kolagenázy

Intersticiálny kolagén typu I, II, III dokážu štiepiť na 2 špecifické časti, $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ fragmenty, práve tieto enzýmy (MMP-1, MMP-8, MMP-13, a MMP-18). Taktiež dokážu štiepiť aj iné zložky extracelulárnej matrix (ECM) a rozpustné proteíny (Tab.1). Enzýmy z tejto skupiny sa podstatne líšia svojou substrátovou špecifickosťou, napríklad neutrofilová kolagenáza MMP-8 uprednostňuje typ I, zatiaľ čo intersticiálna kolagenáza MMP-1 kolagén typu III. MMP-13 síce viaže kolagén typu I, ale neštiepi ho (Allan et al., 1991). MMP-13 štiepi kolagén typu I a III, ale pomalšie ako typ II (Knauper et al., 1996).

4.4.2 Želatinázy

Ako želatinázy sa označujú MMP-2 a MMP-9 pre ich schopnosť ľahko štiepiť želatín. Taktiež štiepia veľké množstvo molekúl ECM ako napríklad kolagén typu IV, V, XI, laminin, fibronektin, agrekan, elastín (Tab.1). MMP-2 dokáže štiepiť aj kolagén typu I, II, III, podobným spôsobom ako kolagenázy (Aimes and Quigley, 1995). Kolagenázová aktivita MMP-2 je podstatne slabšia ako MMP-1, pretože proMMP-2 je lokalizovaná k bunkovému povrchu a aktivovaná na membránu viazanými MT-MMP, a preto je jej kolagenázová aktivita obmedzená na okolie povrchu bunky (Patterson et al., 2001).

4.4.3 Stromelysiny

Stromelysiny (MMP-3, MMP-10, MMP-11) majú usporiadanie domén podobné ako kolagenázy, ale neštiepia intersticiálny kolagén. MMP-3 a MMP-10 majú podobnú štruktúru aj substrátovú špecifickosť, MMP-11 (stromelysin 3) je s nimi málo podobná. Gén pre MMP-11 je lokalizovaný na chromozóme 22, kdežto MMP-3 a MMP-10 na chromozóme 11, spolu s MMP- 1, 7, 8, 12, 20, 26 a 27. MMP-3 a MMP-10 majú širokú substrátovú špecifickosť a čiastočne sa podieľajú aj na proMMP aktivácii. Na strane druhej MMP-11 vykazuje slabú aktivitu voči zložkám extracelulárnej matrix (Murphy et al., 1993), kdežto serpiny (**serine protease inhibitors**) štiepia ochotne.

4.4.4 Matrilysiny

Jedny z najmenších molekúl metaloproteináz medzibunkovej matrix sú práve matrilysiny (MMP-7 a MMP-26). Nemajú hemopexínovú doménu. MMP-7 je syntetizovaná epitelovými bunkami a sekretovaná apikálne. Okrem ECM komponentov upravuje aj molekuly bunkového povrchu, ako napríklad pro- α -defensin, Fas-ligand, pro-tumor nekrotizujúci faktor α a E-kadhesin. MMP-26 je exprimované normálnymi bunkami z endometria a z niektorých nádorov. Štiepi niektoré molekuly extracelulárnej matrix a na rozdiel od väčšiny ostatným MMP je uchovávaný intracelulárne (Marchenko et al., 2004).

4.4.5 Na membránu viazané matrix metaloproteinázy

U cicavcov MT-MMP zahŕňajú štyri transmembránové proteíny (MMP-14, -15, -16 a -24) a dva proteíny zakotvené glykosylfosfatidylinositolovou kotvou (GPI) (MMP-17 a MMP-25). Všetky majú furín- roznávajúcu sekvenciu na C-konci propeptidu, preto sú aktivované intracelulárne a aktívny enzým je sekretovaný na bunkový povrch. Všetky MT-MMP okrem MT4-MMP (MMP-17) dokážu aktivovať proMMP-2 (English et al., 2000). MT1-MMP (MMP-14) ma kolagenázovú aktivitu voči kolagénu typu I, II, III (Ohuchi et al., 1997). MT4-MMP štiepi želatín a syntetické substráty, ale ku kolagénu typu I a IV , fibronektínu či lamininu je intaktná (Wang et al., 1999).

4.4.6 Ostatné metaloproteinázy medzibunkovej matrix

Do tejto skupiny patrí sedem MMP nie sú zaradené do žiadnej špecifickej skupiny. Avšak MMP-12, MMP-20 a MMP-27 má podobnú štruktúru a lokalizáciu na chromozóme ako stromelysiny.

Metaloelastáza (MMP- 12) je exprimovaná primárne v makrofágoch, ale taktiež sa nachádza aj v osteoklastoch (Hou et al., 2004). Štiepi elastín a mnohé ďalšie molekuly ECM. Je esenciálnou pre migráciu makrofágov (Shiple et al., 1996).

MMP-19 štiepi mnohé zložky ECM vrátane komponentov bazálnych membrán (Stracke et al., 2000). Je nazývaná RASI (rheumatoid arthritis synovial inflammation) a nachádza sa v aktivovaných lymfocytoch a v plazme pacientov s reumatoidnou artritídou. Je taktiež rozoznávaná ako autoantigén u pacientov s reumatoidnou artritídou a systémovým lupus erythematosus (Sedlacek et al., 1998). MMP-19 je ale exprimovaná v mnohých orgánoch, vrátane proliferujúcich sa keratinocytoch v hojacich sa ranách (Sadowski et al., 2003).

Enamelysin (MMP-20) je vo veľkom exprimovaný v novo vznikajúcej zubnej sklovine a štiepi amelogenín (Ryu et al., 1999).

MMP-21 je exprimovaná v rôznych tkanivách plodu aj dospelých jedincov a v karcinómoch, kde štiepi želatín (Ahokas et al., 2003).

MMP-23 má na cysteín bohatú C-terminálnu doménu imunoglobulínového typu, miesto hemopexínovej (Velasco et al., 1999). Propeptidu chýba cysteinové zopnutie. Na N-konci propetdidu sa nachádza transmembránová doména, takže sa predpokladalo, že patrí medzi na membránu viazané MMP, ale enzým je po uvoľnení z bunky a zakotvení na membráne šitepený proteínovou konvertázou (Pei et al., 2000).

MMP-27 bol izolovaný poprvýkrát z kuracích embryí, kde dokáže štiepiť želatín a kazeín (Yang and Kurkinen, 1998).

Epilysin (MMP-28) je exprimovaný mnohými orgánmi, ako sú pľúca, placenta, srdce, gastrointestinálny trakt a semenníky. Enzým produkovaný bazálnymi keratinocytmi v epidermis má rolu v hojení rán (Saarialho-Kere et al., 2002)..

MMP-21, MMP-23 a MMP-28 vďaka furín rozoznávajúcej sekvencií sú aktivované intracelulárne a sekretované ako aktívne enzýmy (Nagase et al., 2006).

Nižšie uvádzam tabuľku najpreskúmanejších metaloproteináz medzibunkovej matrix. O tých, ktoré v nej nie sú uvedené, sa vie ešte len málo a sú predmetom bližšieho skúmania. Čo sa týka substrátovej špecifickosti, neuvádzala som všetky, ale len najpodstatnejšie substráty bazálnej membrány a extracelulárnej matrix. MMP majú široké pole pôsobenia aj na mnohé iné biokomponenty ako na ECM či bazálnu membránu, o ktorých sa ale nezmieňujem, pretože by to presiahlo rámec tejto práce. Pri zostrojovaní tabuľky som vychádzala z práci (Nagase et al., 2006) a (Cockett et al., 1998).

Tab.1 : Prehľad MMP, ich substrátov a biologických efektov

Enzýmy	MMP	Substrát	Biologický efekt
Kolagenázy	MMP-1 intersticiálna kolagenáza	Kolagén typu I, II, III, VII a X, želatín, proteoglykan jadrového proteínu	migrácia keratinocytov, obnova epitelov, agregácia trombocytov, nárast GFI a proliferácia, zápalové aj protizápalové účinky, aktivácia PARI
	MMP-8 neutrofilná kolagenáza	Kolagén typu I, II a III, želatín, proteoglykan	
	MMP-13 kolagenáza 3	Kolagén typu I a IV, želatín, proteoglykan, fibronectin, tenascin	aktivácia osteoklastov, zvýšenie kolagénovej afinity, uvoľnenie β -FGF, protizápalové účinky
Želatinázy	MMP-2 želatináza A	želatín, kolagén typu IV, V, VII a XI	diferenciácia mezenchymálnych buniek

			počas zápalu, rast neuritov, zvýšenie kolagénovej afinity, migrácia buniek, protizápalové účinky, nárast TGF- β , vazokonstrikcia, neuronálna apoptóza vedúca k neurodegenerácii
	MMP-9 želatináza B	želatín, kolagén typu IV a V, elastín	zvýšenie kolagénovej afinity, zápalové a protizápalové účinky, rezistencia nádorových buniek, redukcia IL-2 odpovede, nárast TGF- β , neovaskularizácia thymu, hypertrofická apoptóza chondrocytov
Stromelysiny	MMP-3 stromelysin 1	Jadrový proteoglykan, kolagén typu II, IV, IX, X a XI, prokolagén, fibronektin, laminin, elastín, želatín	migrácia buniek, apoptóza buniek prsného epitelu, epitelovo - mesenchymálna konverzia u prsných epitel. buniek, tvorba angiostatínu podobný fragment, uvoľnenie β -FGF, protizápal. účinky, metastázy
	MMP-10 stromelysin 2	Rovnaké ako u stromelysinu 1	
	MMP-11 stromelysin 3	Alfa-1 proteínaza inhibítor	nárast GF1 a delenie buniek
Matrilysiny	MMP-7	Proteoglykan, kolagén typu IV, elastín, fibronektin, želatín	diferenciácia adipocytov, metastázy, Fas- receptorom sprostredkovaná apoptóza, zápalové stavy, aktivácia osteoklastov, vazokonstrikcia a rast buniek
Na membráne viazané MMP	MMP-14 MT1-MMP	Proželatináza A, prokolagenáza 3, kolagén, proteoglykan, fibronektin, tenascin	migrácia buniek, tubogenézia obličiek, metastázy, pripevnenie embrya na epitel maternice
	MMP-15 MT2-MMP	Rovnako ako u MT1-MMP	metastázy,
	MMP-16 MT3-MMP	Proželatináza A	metastázy
Ostatné	MMP-12 makrofágová elastáza	elastín	migrácia makrofágov

5. Metaloproteinázy medzibunkovej matrix v prednom očnom segmente

Oko predstavuje veľmi dôležitý, komplexný a vysoko vyvinutý fotorecepčný orgán. Úlohou predných častí oka, ktoré sú v kontakte s vonkajším prostredím, hlavne rohovky a prídavných orgánov, je chrániť vnútorné časti oka pred nepriaznivými vplyvmi vonkajšieho prostredia.

Zachovanie a oprava medzibunkovej matrix vyžaduje koordinovanú rovnováhu medzi syntézou, degradáciou a remodeláciou jednotlivých jej komponent. Proteolytické enzýmy vykonávajú dôležité fyziologické funkcie v pomalom obrate a remodelácií zložiek medzibunkovej hmoty. Metaloproteinázy medzibunkovej matrix sú prirodzene produkované normálnym, nepoškodeným tkanivom. Rovnako ako MMP sú prirodzene produkované aj ich inhibítory – α 2-makroglobulin, α -1-inhibítory proteínáz (Strickland et al., 1990) a samozrejme TIMP-y, aby predchádzali neprimeranej degradácii normálneho, zdravého tkaniva. Porucha tohto systému sa objavuje keď nastane nerovnováha medzi proteázami a ich inhibítormi v prospech proteínáz, pretože spôsobujú patologickú degradáciu stromálného kolagénu a proteoglykanov. Akákoľvek nerovnováha vedie k fibrózam (inhibítory > proteínázy) alebo k nadmernej deštrukcii tkaniva (proteínázy > inhibítory) (Ollivier et al., 2007).

Expresia je kontrolovaná radou cytokínov, rastovými faktormi, hormónmi, medzibunkovými interakciami či interakciami medzi matrix a bunkami (Nagase and Woessner, 1999). Zápalové stavy sú takmer vždy charakterizované deregulovanou, často zvýšenou aktivitou matrixových metaloproteináz (Parks et al., 2004)

Hojenie poškodeného tkaniva zahŕňa koordináciu mnohých procesov, ktorých úlohou je ochrániť miesto defektu a rýchlo obnoviť funkciu bariéry. Medzi tieto procesy patrí migrácia, proliferácia a diferenciácia epitelových buniek. Počas hojenia rohovky, bunky epitelu migrujú bez proliferácie, až kým rana nie je zahojená. Po uzatvorení rany, proliferácia a pohyb buniek z bazálnej membrány vytvárajú viacvrstevnú štruktúru (Singer and Clark, 1999). Migrácia buniek a proliferácia sú kľúčovými procesmi pre re-epitelizáciu počas hojenia poškodenia rohovky. Tieto procesy bývajú sprostredkované aktiváciou MMP a regulované rôznymi rastovými faktormi sekretovanými z epitelových a stromálnych buniek (Sharma et al., 2003).

5.1 Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v rohovke

5.1.1 Stavba rohovky

Je úplne bezfarebná a dokonale priehľadná. Na priečnom reze môžeme rozlíšiť 5 vrstiev: epitel, Bowmanova membrána, stróma, Descemetova membrána a endotel (Obr.4).

Rohovkový epitel je vrstevnatý, dlaždicový, nezrohovatený a skladá sa z 5-6 vrstiev buniek. V bazálnej časti epitelu nachádzame početné mitózy, ktoré rohovku obdarujú regeneračnou schopnosťou. Bunky sa tu kompletne obnovia približne každých 7 dní. Povrchové bunky sú opatrené mikrokĺkmi, ktoré prenikajú do prekorneálneho ochranného slzného filmu, obsahujúci lipidy a glykoproteíny.

Pod epitelom sa nachádza hrubá homogénna vrstva o v priemere 7 – 12 μm . Pozostáva z náhodne sa krížiacich vlákien kolagénu, hlavne typu I, kondenzovanej medzibunkovej hmoty a neobsahuje žiadne bunky. Je to Bowmanova membrána, ktorá veľkou mierou prispieva k stabilite a spevneniu rohovky.

Rohovkové stróma je tvorené vláknami z kolagénu typu I, ktoré sú usporiadané do lamiel. Kolagénne vlákna prebiehajú v každej z lamiel rovnobežne a prechádzajú celou šírkou rohovky. Medzi niekoľkými vrstvami sa nachádzajú cytoplazmatické výbežky fibroblastov. Vlákna aj bunky sú zanorené do amorfnej glykoproteínovej substancie, bohatej na chondroitin sulfát

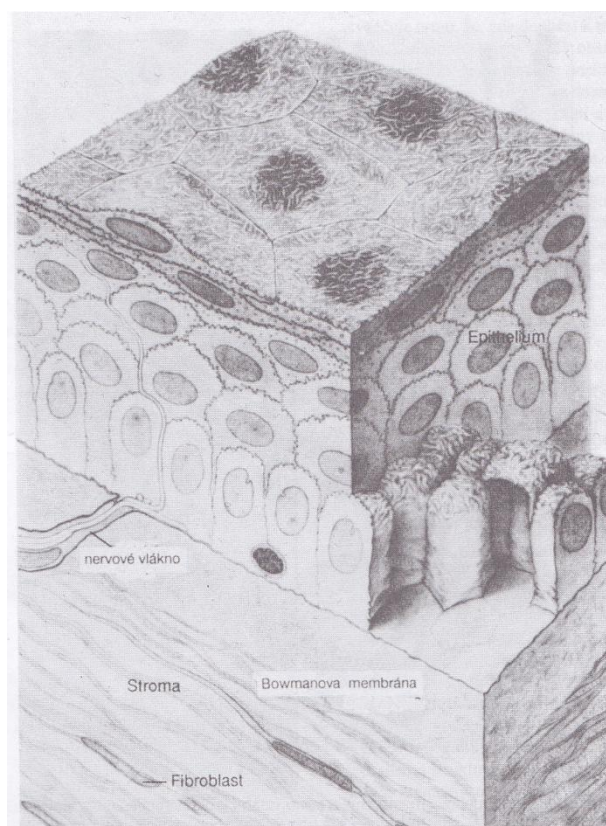
Membrana Descemeti je homogénna vrstva zložená z jemných kolagénnych vlákien usporiadaných do trojrozmernej siete. Vlákna sú prevažne zložené z kolagénu IV. typu.

Endotel rohovky je jednovrstevný dlaždicový epitel. Jeho bunky obsahujú organely, charakteristické pre elementy zaisťujúce aktívny transport a syntézu sekrečných proteínov.

Všetky časti rohovky sú zodpovedné za udržiavanie transparenencie rohovky – jej priesvitnosti.¹

¹ Opis stavby a štruktúry rohovky a jej nákres je z knihy *Základy histologie*.

Obr. 4 Trojrozmerný nákres rohovky



Limbus tvorí prechod medzi transparentnými kolagénymi zväzkami rohovky a bielymi nepriehľadnými vláknami bielka. Je bohato vaskularizovaný a jeho cievy hrajú dôležitú úlohu pri zápalových procesoch v rohovke, bezcievnatá rohovka je vyživovaná metabolitmi difúziou z priľahlých ciev.

5.1.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v rohovke

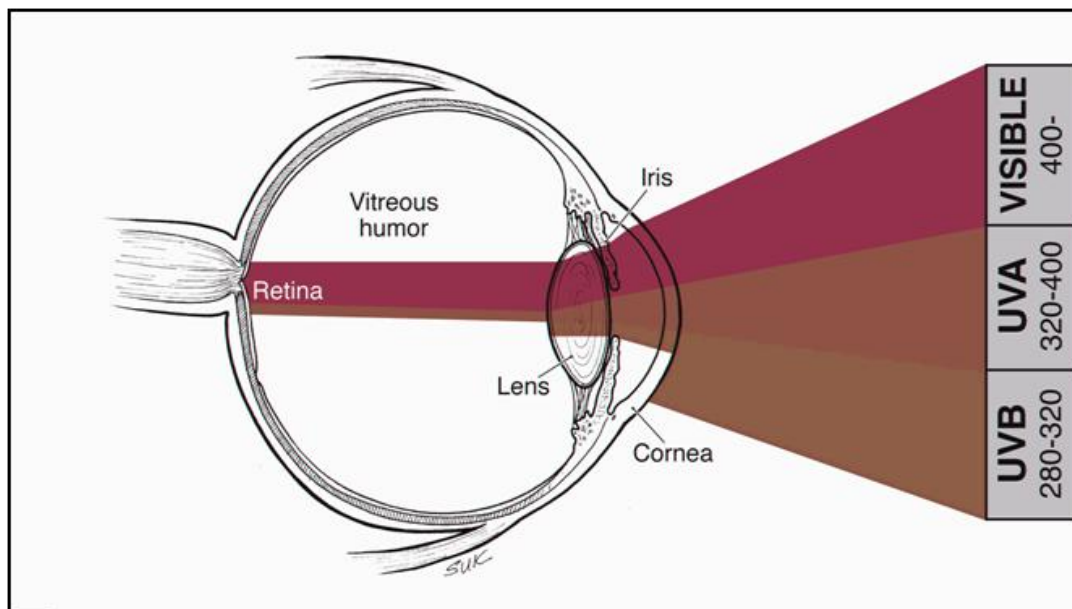
V prípade zranenia rohovky, dochádza k aktivácii mnohých komplexných a koordinovaných bunkových procesov, ktoré napokon vedú k zahojeniu. Uzdravenie poškodenej rohovky je mimoriadne zložitý proces, ktorý zahŕňa spoluprácu mnohých rozmanitých proteináz, rastových faktorov, cytokínov a inhibítorov proteináz produkovaných bunkami epitelu, stromálnymi keratocytmi, slznými žľazami či bunkami imunitného systému (Ollivier et al., 2007).

Rohovka je citlivá voči ultrafialovému žiareniu (UV), ktoré môže spôsobiť akútnu aj chronickú keratitídu. Fototoxické efekty v rohovke sa vyskytujú na niekoľkých úrovniach. V epitelu – UV svetlo inhibuje mitózu, spôsobuje fragmentáciu jadra, prípadne stratu celej

vrstvy epitelu. V stróme boli nájdené reverzibilné zmeny v keratocytoch. Tieto efekty UV žiarenia na strómu boli experimentálne pozorované v oku kráľika. (Ringvold and Davanger, 1985) Zmeny na endoteli boli skúmané u japonských zváračoch. Boli zistené pleomorfné zmeny na endotelových bunkách – zníženie počtu hexagonálnych buniek. Nebolo to spojené s vizuálnym alebo funkčným deficitom (Kurai et al., 1984).

Zaujímavým, ale nie neočakávaným faktom je, že celá rohovka toleruje vyššie dávky UV žiarenia (100mJ/cm²) ako kultivované keratocyty, ktoré vykazovali zmeny už pri polovičných dávkach. To je spôsobené pravdepodobne tým, že má neporušenú vrstvu epitelu, ktorá absorbuje podstatné množstvo tohto žiarenia. UV je absorbované nukleovými kyselinami a aromatickými aminokyselinami prítomnými v epitelu. (Schein, 1992)

Obr. 5: Absorpcia jednotlivých zložiek slnečného žiarenia očnými tkanivami



Kým väčšina viditeľného žiarenia prechádza očnými tkanivami až k sietnici, UVA a UVB zložky sú absorbované prevažne v prednom očnom segmente. (U.S. Global Change Research Information Office)

V ľudskej rohovke bola detekovaná expresia MMP-2 a MMP-9 v epitelu aj fibroblastoch (Fini and Girard, 1990; Matsubara et al., 1991). Určité množstvo MMP-2 bolo zistené aj v neožiarených fibroblastoch, no po vystavení UV žiareniu nastal podstatný nárast množstva tejto proteínázy. Avšak nárast nebol závislý na dávke žiarenia. V bunkách epitelu nebol pozorovaný nárast hladiny MMP-2. MMP-9 sa nachádza v stopových množstvách v normálnych bunkách epitelu. Toto množstvo sa nijak podstatne nezvýšilo ani po vystavení

UV žiarení. Taktiež nebola detegovaná zvýšená produkcia MMP-9 v ľudských fibroblastoch rohovky. (Kozak et al., 2003) Toto môže byť spôsobené tým, že MMP-9 je produkovaná najmä bunkami bazálnej membrány a spájaná s poraneniami zasahujúce práve bazálnu membránu (Matsubara et al., 1991). Kozák et al. (2003) skúmali produkciu želatináz v akútnej fázi.

Produkcia MMP-2 a -9 bola skúmaná aj u psej rohovky. Chandler et al. (2008) zisťovali rozdiel medzi hladinou týchto proteináz v normálnej, nepoškodenej rohovke a v rohovke s chronickou povrchovou keratitídou. Chronická povrchná keratitída je progresívne ochorenie spojené so zápalom a môže spôsobovať až oslepnutie. V počiatočných štádiách, bunky epitelu proliferujú a stróma pri povrchu je infiltrovaná plazmatickými bunkami, lymfocytmi, neutrofilmi a makrofágmi. (Bedford and Longstaffe, 1979) Ako ochorenie postupuje, melanocyty a fibrocyty vstupujú do stromy, nasleduje vaskularizácia a edém. Presná etiológia tohto ochorenia nie je úplne jasná, ale tento stav súvisí s externými faktormi ako je UV žiarenie. Chandler et al. (2008) pozorovali, že na rozdiel od nepoškodeného tkaniva, ktoré produkovalo MMP-2 a málo MMP-9, všetky vzorky z rohovky s chronickou keratitídou sú vysoko pozitívne na prítomnosť MMP-2 aj MMP-9, ktorých expresia bola detegovaná aj v epitelu aj v stróme. Ďalej zistili, že hladina oboch metaloproteináz medzibunkovej matrix v bunkách epitelu aj vo fibroblastoch je závislá na dávke UV žiarenia a že tvorba MMP bola podstatne menej výrazná vo fibroblastoch. Taktiež pozorovali, že po ožiarení bola indukcia MMP-2 skôr v epitelových bunkách, zatiaľ čo MMP-9 v stromálnych fibroblastoch (Chandler et al., 2008). Ani Kozak et al.(2003), ani Chandler et al. (2008) neskúmali vplyv UV na hladinu inhibítorov a ich vzájomný pomer s MMP.

Skvamózna neoplázia očného povrchu je dysplaztické alebo karcinogénne poškodenie vychádzajúce z epitelových buniek spojivky, limbu alebo rohovky. Etiológia tohto ochorenia nebola ešte úplne stanovená. Medzi rizikové faktory patrí aj chronické vystavenie UV žiarení. Aj v tomto prípade, jemne vyladená rovnováha medzi TIMP a MMP je rozhodujúca. Pri porovnaní množstva MMP a TIMP v poškodenom a normálnom tkanive bolo zistené, že hladina MMP-1 bola vyššia štvornásobne, MMP-3 trojnásobne a MMP-2 asi o jednu pätinu. Množstvo TIMP-2 a -3 sa takmer zdvojnásobilo a hladina TIMP-1 sa takmer nezmenila (Ng et al., 2008). Tieto inhibítory síce pôsobia proti MMP, no ich nepomerne vysoké zastúpenie TIMP v tomto poškodení je zvláštne a môže naznačovať prirodzenú odpoveď nádorov na produkciu enzýmov. Prípadne, už bola dokumentovaná schopnosť týchto inhibítorov aj aktivovať MMP (Imai et al., 1996; Strongin et al., 1995; Zhao et al., 2004) , pôsobiť mitogenicky (Hayakawa et al., 1994), či antiapoptoticky (Valente et al., 1998), čím v podstate

poskytujú alternatívnu cestu pre šírenie nádorov. Jiang et al. (2002) navrhol model, ktorý hovorí o tom, že aj keď majú vlastnosť inhibície v neskoršej fáze progresie nádorov, ich antiapoptotické funkcie a stimulačné schopnosti môžu vytvárať mikroprostredie pre rast nádorov počas skorej fáze. (Jiang et al., 2002)

Pterygia je vysoko vaskularizovaná, proliferujúca a invazívna porucha povrchu oka, ktorá vzniká v limbe. Vzniká poruchou regulácie hojenia poškodenia, v ktorom modifikované molekulárne mechanizmy vedú k apoptóze buniek. Pterygia je charakterizovaná aj rozpadom Bowmanovej vrstvy, ktorá obsahuje najmä kolagén typu I a III. Za tento stav sú zodpovedné hlavne MMP-1, -2, -3 a -9, ktoré sú produkované predovšetkým fibroblastmi a pozmenenými limbálnymi bunkami – bunkami pterygie. Tieto bunky produkujú aj membránové matrix metaloproteinázy, konkrétne MT1- MMP (MMP-14) a MT2-MMP (MMP-15), ktoré spôsobujú rozpad hemidesmosomových spojení. Normálne tkanivo produkovalo malé, takmer nedetekovateľné množstvo týchto MMP, okrem MT-1MMP, ktorá bola pozorovaná na povrchu buniek epitelu (Dushku et al., 2001). Di Girolamo et al. (2003) sa sústredili najmä na MMP-1 kvôli jej vlastnosti podporovať migráciu buniek, a preto je považovaná za chemoatraktant. Taktiež jej aktivitou vznikajú peptidy z kolagénu typu I, ktoré pôsobia chemotakticky pre ľudské leukocyty (Malone et al., 1991) in (Di Girolamo et al., 2003). Expressia MMP-1 bola zvýšená v epitelových bunkách postihnutých pterygiou a ešte sa zvýšila pri vystavení UVB žiareniu v porovnaní s epitelovými bunkami za fyziologických podmienok a po ich ožiarení. Zistili, že je jej hladina závislá na dávke UVB aj čase, v ktorom boli tieto bunky vystavené žiareniu. To isté sa ale nedá povedať o jej regulačnej molekule – TIMP-1, čo naznačuje, že expresia oboch génov je disregulovaná odpoveď na UV žiarenie (Di Girolamo et al., 2003).

Sjögrenov syndróm (pSS) je systematické autoimunitné ochorenie, charakterizované deštrukciou slzných a slinných žliaz. S pSS sa spája aj keratolýza (rozpad rohovky), pri ktorej rozvoj epitelových defektov a postupný rozpad stromálnych komponentov vedie k vážnym poruchám rohovky (Fox, 2007) in (Brejchova et al., 2009). Brejchova et al. (2009) ako prví skúmali spojitosť MMP s keratolýzou u Sjögrenovho syndrómu. Dokázali najvyššiu aktivitu MMP-1 a vysokú expresiu MMP-9 a -3 v epiteli a stróme. Detegovali prítomnosť MMP-7, ale vo väčšine prípadov v neaktívnej forme. Zdá sa, že má úlohu pri degradácii bazálnej membrány, keďže ho najviac bolo v epiteli, najmä v bazálnej vrstve. Prítomnosť MMP-8 bola mierna až slabá v epiteli aj v stróme. Pri štúdiu pacientov po operácii šedého zákalu, bola nájdená významne zvýšená tvorba tohto enzýmu jak v epiteli, tak aj v stróme (O'Brien et al., 2001). Tento fakt je pripisovaný tomu, že výskyt MMP-8 v stróme závisí na prítomnosti

neutrofilov (Kuffova et al., 1999) in (O'Brien et al., 2001). Brejchova et al. (2009) ďalej detegovali slabú prítomnosť MMP-13 v stróme. Expresia tohto enzýmu bola doposiaľ detegovaná v epiteli hojacich sa rán (Ye et al., 2000). Taktiež demonštrovali variabilitu expresie MMP-2. Iba 2 prípady z 11 odhalili významný nárast MMP-2 v porovnaní s kontrolami. Gabison et al.(2003) poukázali na vysokú úroveň expresie MMP-2 v epiteli aj stróme. Na strane druhej iná štúdia demonštrovala slabú prítomnosť MMP-2 (O'Brien et al., 2001). Možným vysvetlením tohto fenoménu je, že aktivita MMP-2 je obmedzená na kratšiu dobu, na rozdiel od ostatných MMP. Táto hypotéza je podporovaná faktom, že nárast aktivity tohto enzýmu v rohovke po alkalickom poškodení má zdržanie, čo naznačuje jeho úlohou je skôr v regenerácii a remodelácii extracelulárnej matrix ako v degradačných procesoch (Ye and Azar, 1998).

Mikroorganizmy, bunky spôsobujúce zápal, bunky rohovkového epitelu a aktivované fibroblasty produkujú a uvoľňujú proteolytické enzýmy. Ak sú produkované bunkami rohovky či zápalovými bunkami (makrofágy, neutrofilné granulocyty) ide o endogénne proteínázy. Extracelulárne enzýmy bakteriálneho či mykotického pôvodu prispievajú priamo alebo nepriamo k stavu rohovky a to aktiváciou endogénnych proteínáz. (Ollivier et al., 2007)

Baktéria *Pseudomonas aeruginosa* dokáže spôsobiť mikrobiálnu keratitídu charakterizovanú vredmi a poškodením rohovky. Infiltrácia leukocytov na miesto infekcie a produkcia prozápalových cytokínov sú hlavnými príčinami rohovkového zápalu. IL-1 β – cytokín so svojou úlohou v zápalových stavoch, dokáže aj indukovať tvorbu chemoatraktantov pre neutrofilné leukocyty, ktoré prispievajú k poškodeniu tkanív aktiváciou a sekréciou práve metaloproteináz medzibunkovej matrix, čo vedie k nerovnováhe medzi hladinou MMP a TIMP. (Xue et al., 2003) IL-1 β má stimulačný efekt pre MMP-9 v kultivovaných rohovkových bunkách epitelu (Li et al., 2001), čo potvrdzujú pokusy Xue et al. (2003) na myších rohovkách infikovanými *Pseudomonas aeruginosa*, liečenými anti-IL-1 β protilátkou, ktoré ukazovali na podstatné zníženie množstva proteínu MMP-9 po tejto liečbe. To naznačuje úlohu MMP-9 pri degradácii strómy po bakteriálnej infekcii a zápale. IL-1 β nemá veľký vplyv na hladinu TIMP-1 a-2 (dvojnásobný nárast) v porovnaní na MMP-9 (päťnásobný nárast). To spôsobuje nerovnováhu systému a prevládajúcu degradáciu. Taktiež zisťovali aj vplyv IL-1 β na MMP-2. Množstvo MMP-2 sa nezmenilo vôbec alebo len minimálne, čo naznačuje, že sa tu nachádza konštitutívne, prípadne, že svoju úlohu v hojení poškodenia má až v neskoršom štádiu. Iná práca ukazuje na fakt, že zvýšená hladina aktivovanej MMP-9 môže mať rolu v remodelácii novo syntetizovaných komponent matrix a v regenerácii tkaniva rohovky v ranej fáze hojenia (Ye and Azar, 1998).

TNF- α a IL-1 β regulujú aj expresiu ďalších skupín MMP, a to kolagenáz (MMP-1, -13) a stromelysinov (MMP-3, -10, -11) v ľudských bunkách rohovky. Prozápalove cytokíny IL-1 β a TNF- α zvýšili produkciu a aktivitu MMP-1 a -13 v epiteli rohovky a ich množstvo bolo závislé na dávke cytokinov. Tieto nálezy poukazujú na dôležitosť kolagenáz v patológii rohovky. Stimulovaná MMP-1, ktorá je kritická pre re-epitelizáciu a MMP-13 s potenciálnymi proteolytickými vlastnosťami a širokým rozsahom substrátov hrajú rolu v remodelácii kolagénovej matrix v chronických ochoreniach, deštrukcie matrix a vrednatení rohovky. (Li et al., 2003) Na očnom povrchu, MMP-13 bola detegovaná pri hojení rán na rohovke krýs, ale nie za normálnych podmienok. Produkovaná bola exkluzívne bazálnymi bunkami. (Ye et al., 2000) Taktiež bola pozorovaná prítomnosť MMP-1 a MMP-13 pri experimentálne vyvolanej neovaskularizácii u králikov. (Huang et al., 2001) . Aj u ľudí bola hladina MMP-13 za normálnych okolností sotva detekovateľná.

Ľudské bunky rohovky exprimuje všetky tri stromelysiny v závislosti na TNF- α a IL-1 β a ich expresia je závislá na dávke. MMP-11 narástla len mierne (Li et al., 2003).

Pri skúmaní fungálnej keratitídy, presnejšie po infekcii *Fusarium solani*, bol zaznamenaný nárast MMP-9, ale nie nárast MMP-2 (Mitchell et al., 2007).

Herpesová keratitída, spôsobená vírusom herpes simplex typu I, môže viesť k poškodeniu tkaniva rohovky vrátane jej vredovatenia, neovaskularizácie a perforácie. Bolo zistené, že MMP-2, MMP-8 a MMP-9 sú sekretované zápalovými bunkami, bunkami epitelu a stromálnymi fibroblastmi 2 dni po infekcii vírusom, no v priebehu ďalších piatich dní ich množstvo kleslo, kým bunky epitelu a fibroblasty naďalej produkovali TIMP-1 a -2, ktoré sú, zdá sa, zodpovedné za pokles príslušných matrix metaloproteináz a tým limitovali poškodenie tkaniva. Avšak v priebehu infekcie, v čase progresívneho poškodenia tkaniva spojeného s herpesovou keratitídou, expresia MMP-2, -8 a -9 opäť narastá, čo koreluje s masívnou infiltráciou leukocytov do rohovky. Zároveň množstvo TIMP-1 klesá a TIMP-2 výrazne narastá. Tieto metaloproteinázy medzibunkovej matrix majú význam pri ničení strómy a vredovatení rohovky, no taktiež neskoršie zohrávajú aj podstatnú časť pri liečení (Yang et al., 2003).

Po prevedení keratektómie bola zistená zvýšená aktivita MMP-1, ktorá bola lokalizovaná blízko bazálnej membrány pri okraji rany v mieste aktívnej migrácie a taktiež v stróme, kam zasahovalo poranenie, preto sa predpokladá, že MMP-1 je kľúčovým mediátorom migrácie buniek. MMP-2 a -9 boli lokalizované pri okraji migrujúceho epitelu, čo indikuje ich rolu v remodelácii strómy a zostavovaní skoršej bazálnej membrány. Menšie množstvo MMP-3 bolo taktiež detegované v stróme, rovnako ako aj MMP-2 bola mierne exprimovaná v stróme,

ale len málo sa podieľala na remodelácii strómy a zdá sa, že ani nemá vplyv na oprave epitelu (Mulholland et al., 2005). MMP-7 je exprimovaná migrujúcimi epitelovými bazálnymi bunkami (Lu et al., 1999). Štúdie na knock-outových myšiach naznačujú, že MMP-7 má úlohu v inhibícii sekundárnej neovaskularizácii rany (Kure et al., 2003). Expresia MMP-13 a -14 je podobná MMP-2 a -9, respektíve s podobnou úlohou v regulácii stromálnej remodelácii po poranení (Ye et al., 2000). Taktiež MMP-12 je exprimovaná v epiteli rohovky počas hojenia a má svoju úlohu pri migrácii a proliferácii týchto buniek (Lyu and Joo, 2005).

5.2. Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v šošovke

5.2.1 Štruktúra šošovky

Tento bikonvexný útvar sa vyznačuje neobyčajnou pružnosťou; túto vlastnosť avšak stráca s vekom a šošovka postupne tvrdne. Skladá sa z troch základných komponent: puzdro, subkapsulárny epitel a vlákna šošovky.

Puzdro šošovky je homogénne a refraktilné, bohaté na sacharidy, ktoré obaľujú vonkajší povrch epitelových buniek. Je pružné a skladá sa najmä z kolagénu IV. typu a amorfných glykoproteínov.

Subkapsulárny epitel predstavuje jedinú vrstvu kubických buniek, ktorá je vytvorená len na prednej strane šošovky.

Vlákna šošovky sú pretiahnuté a vytvárajú tenké sploštené štruktúry. Sú to vysoko diferencované elementy odvodené z buniek subkapsulárneho epitelu. Tieto bunky obsahujú skupinu proteínov, nazývaných kryštaliny.² Kryštaliny sú rozpustné proteíny a tvoria cca 90% všetkých proteínov v šošovke. V ľudskom oku sa nachádzajú tri hlavne typy α -, β -, γ -kryštalín. β - a γ -kryštalíny sa primárne nachádzajú práve v šošovke, kde vytvárajú agregáty, následne tenké fibrily a zvyšujú tým index refrakcie. Patrí do veľkej proteínovej rodiny chaperonov. (Andley, 2007)

5.2.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v šošovke

MMP-2 a MMP-9 veľmi ochotne štiepia práve kolagén typu IV a laminin. Za predpokladu, že práve tieto enzýmy, produkované epitelovými bunkami šošovky, sa podieľajú na hojení po operácii šedého zákalu, boli vypracované štúdie, ktoré porovnávajú úroveň ich expresie pred a po operácii. Výsledok pozorovania naznačoval, že MMP-2 má pravdepodobne úlohu

² Opis stavby a štruktúry šošovky je z knihy *Základy histologie*

v migrácii epitelových buniek šošovky, pretože jej prítomnosť bola detegovaná 2 dni po operácii a do tejto doby nebola pozorovaná migrácia buniek. Taktiež MMP-9 bola sekretovaná vo vyššej miere ako v kontrolných šošovkách (Li et al., 2008) . Bolo produkované viac MMP-2 ako MMP-9, čo súhlasí aj s pozorovaním Wormstone et al. (Wormstone et al., 2002)

MMP sa môžu podieľať aj na agregácii β -kryštalínu (Trivedi et al., 1999), proliferácii, migrácii buniek a zmien v extracelulárnej matrix, čo sú deje charakteristické pre šedý zákal. Šedý zákal je dosť bežným ochorením, ktoré postihuje predovšetkým šošovku a môže viesť až k oslepnutiu. Normálne šošovky produkovali malé množstvo MMP-1, -2, -3 a TIMP-1, -2, -3, ktoré boli produkované bunkami epitelu. V šošovkách so šedým zákalom nastal podstatný nárast expresie MMP-1 vo vláknach v oblastiach so zakalením. Z tohto faktu vychádza predpoklad, že má potenciál zohrávať dôležitú úlohu pri agregácii kryštalínu a remodelácii matrix u šošoviek pri šedom zákale. Hladina MMP-2, -3, -9 a TIMP-1, -2 a -3 bola v porovnaní s MMP-1 nižšia, ale vyššia v porovnaní s kontrolnými vzorkami (Sachdev et al., 2004). Práca Hodgkinson et al. (2007) potvrdzuje výsledky Sachdev et al.(2004) o zvýšenom množstve MMP-1 pri šedom zákale, o prítomnosti MMP-1, -2, -3, -9 a TIMP-1, -2, -3 v normálnych šošovkách a zároveň dopĺňa informácie o membránových matrix metaloproteinázach. Pozorovali ich relatívne vysokú expresiu na membráne, čo nie je prekvapujúce, pretože tkanivo ako je šošovka na veľkú hustotu membránových komponent a sú tu prítomné, pravdepodobne kvôli ich vlastnosti aktivovať ďalšie proMMP (English et al., 2000). Porovnateľne nižšia produkcia MMP-2 a MMP-9 bola pozorovaná pri nepoškodenej šošovke ako pri poškodenej (Hodgkinson et al., 2007). Množstvo vypracovaných štúdií o spojitosti MMP-2 a -9 so šedým zákalom narastá. Hľadajú sa rôzne ich regulátory a rôzne možnosti inhibície. Jedným z najvýznamnejších rastových faktorov ovplyvňujúcich ich produkciu je TGF- β (Dwivedi et al., 2006). Rovnaké výsledky, ktoré potvrdzovali nárast produkcie MMP-2, sprevádzaný aj nárastom expresie MMP-9 v závislosti na TGF- β pozoroval aj Awasthi et al. (2008). MMP-9 sa podieľa na patológii hlavne tým, že je jedným z enzýmov, ktoré sa vyznačujú svojou schopnosťou štiepiť β -kryštalín a penetrovať šošovku (Descamps et al., 2005).

Po experimentálnom odstránení šošovky u *Xenopus laevis*, dochádzalo k expresii aj metaloproteináz medzibunkovej matrix, medzi ktorými boli MMP-9, -13, -14, -16, -18 a TIMP-3, kde výraznejšiu úlohu majú hlavne MMP-13 a -16. Prítomnosť MMP-9, -14 a -18 je skôr asociovaná s hojením poškodenia rohovky, ktoré je úzko spojené s regeneráciou šošovky (Malloch et al., 2009).

Tab.2: Zoznam konštitutívne produkovaných MMP a TIMP v šošovke

Štúdia	MMP
(Hodgkinson et al., 2007)	MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-21, MMP-23, MMP-24, MMP-28, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4
(Sachdev et al., 2004)	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3

5.3 Úloha metaloproteináz medzibunkovej matrix v dúhovke

5.3.1 Štruktúra dúhovky

Dúhovka je výbežkom cievnatky, čiastočne prekrýva šošovku s výnimkou malého otvoru umiestneného v strede, ktorý sa nazýva zornica – pupilla.

Predná plocha iris je nepravidelná a hrboľatá. Vytvára ju nesúvislá vrstva pigmentových buniek a fibroblastov. Pod touto vrstvou sa nachádza slabo vaskularizované väzivo s malým množstvom vlákien a množstvom fibroblastov a melanocytov. Ďalšiu vrstvu tvoria početné cievy zanorené v riedkej väzivovej časti. Zadná hladká plocha dúhovky je krytá dvoma vrstvami epitelu.³

5.3.2 Expresia a distribúcia metaloproteináz medzibunkovej matrix v dúhovke

Distribúcia MMP-1, -2, -3, -9 a TIMP-1, -2, -4 vykazovali rovnaký trend. V dúhovke ich množstvo klesalo v tomto poradí: predný (anterior) okraj > predný epitel > stromálne bunky > zadný epitel (posterior). TIMP-3 bol lokalizovaný na bazálnej membráne epitelu (Lan et al., 2003).

Pre značné množstvo melanínu v epiteli dúhovky, nie je tradičná metóda výskumu lokalizácie vhodná. To je dôvodom, prečo na túto tematiku nie je vypracované dostatočné množstvo publikácií (Klisovic et al., 2001).

³ Opis štruktúry dúhovky je z knihy *Základy histologie*.

6. Záver

Cieľom tejto práce bolo zhrnúť poznatky o úlohe matrixových metaloproteináz v prednom segmente oka za rôznych patofyziologických stavov. Vo všeobecnosti sa dá o týchto enzýmoch povedať, že sú konštitutívne, v malom množstve spolu so svojimi inhibítormi, produkované epitelovými bunkami a fibroblastmi, kde sa podieľajú na remodelácií medzibunkových priestorov. V normálnych tkanivách predného očnému segmentu sú aktivity matrix metaloproteináz vybalancované s expresiou ich prirodzených inhibítorov, takže je zaistená rovnováha medzi syntézou a degradáciou základných komponent (kolagénu, glykosaminoglykanov) extracelulárnej matrix. Avšak za patologických okolností je táto rovnováha často narušená zvýšenou expresiou matrix metaloproteináz a naopak zníženou expresiou ich tkanivových inhibítorov. Nedávne štúdie taktiež dokázali, že pôsobenie metaloproteináz je omnoho komplexnejšie. Objav nových substrátov metaloproteináz medzibunkovej matrix, ako sú receptory rastových faktorov, molekuly bunkovej adhézie, chemokíny, cytokíny, apoptotické ligandy, angiogénne faktory a iné, svedčí o fakte, že funkciou metaloproteináz nie je len mechanický proces priamej degradácie komponent extracelulárnej matrix a bazálnej membrány, ale aj účasť v celej rade fyziologických a patofyziologických procesov.

Ďalší výskum molekulárnych mechanizmov aktivácie a alternatívnych spôsobov inhibície poskytne odpovede ako predchádzať deštrukčným efektom, ktorými tieto proteíny oplývajú.

7. Zoznam literatúry

- Ahokas, K., Lohi, J., Illman, S. A., Llano, E., Elomaa, O., Impola, U., Karjalainen-Lindsberg, M. L., and Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor-beta 1 in keratinocytes. *Laboratory Investigation* 83, 1887-1899.
- Aimes, R. T., and Quigley, J. P. (1995). MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IS AN INTERSTITIAL COLLAGENASE - INHIBITOR-FREE ENZYME CATALYZES THE CLEAVAGE OF COLLAGEN FIBRILS AND SOLUBLE NATIVE TYPE-I COLLAGEN GENERATING THE SPECIFIC 3/4-LENGTH AND 1/4-LENGTH FRAGMENTS. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5872-5876.
- Allan, J. A., Hembry, R. M., Angal, S., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1991). BINDING OF LATENT AND HIGH MR-ACTIVE FORMS OF STROMELYSIN TO COLLAGEN IS MEDIATED BY THE C-TERMINAL DOMAIN. *Journal of Cell Science* 99, 789-795.
- Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research* 26, 78-98.
- Baker, A. H., Edwards, D. R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* 115, 3719-3727.
- Bedford, P. G. C., and Longstaffe, J. A. (1979). CORNEAL PANNUS (CHRONIC SUPERFICIAL KERATITIS) IN THE GERMAN SHEPHERD DOG. *Journal of Small Animal Practice* 20, 41-56.
- Bode, W. (1995). A HELPING HAND FOR COLLAGENASES - THE HEMOPEXIN-LIKE DOMAIN. *Structure* 3, 527-530.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S., and Tschesche, H. (1994). THE X-RAY CRYSTAL-STRUCTURE OF THE CATALYTIC DOMAIN OF HUMAN NEUTROPHIL COLLAGENASE INHIBITED BY A SUBSTRATE-ANALOG REVEALS THE ESSENTIALS FOR CATALYSIS AND SPECIFICITY. *Embo Journal* 13, 1263-1269.
- Brejchova, K., Liskova, P., Hrdlickova, E., Filipec, M., and Jirsova, K. (2009). Matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting associated with primary Sjorgen's syndrome. *Molecular Vision* 15, 2364-2372.
- Chandler, H. L., Kusewitt, D. E., and Colitz, C. M. H. (2008). Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea. *Veterinary Ophthalmology* 11, 135-144.
- Cockett, M. I., Murphy, G., Birch, M. L., O'Connell, J. P., Crabbe, T., Millican, A. T., Hart, I. R., and Docherty, A. J. P. (1998). Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. In *Mammary Development in Cancer*, P.S. Rudland, D.G. Fernig, S. Leinster, and G.G. Lunt, eds., pp. 295-313.
- Descamps, F. J., Martens, E., Proost, P., Starckx, S., Van den Steen, P. E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2005). Gelatinase B/matrixmetalloproteinase-9 provokes cataract by cleaving lens beta B1 crystallin. *Faseb Journal* 19, 29-35.
- Di Girolamo, N., Coroneo, M. T., and Wakefield, D. (2003). UVB-elicited induction of MMP-1 expression in human ocular surface epithelial cells is mediated through the ERKI/2 MAPK-dependent pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 4705-4714.

Dushku, N., John, M. K., Schultz, G. S., and Reid, T. W. (2001). Pterygia pathogenesis - Corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Archives of Ophthalmology* 119, 695-706.

Dwivedi, D. J., Pino, G., Banh, A., Nathu, Z., Howchin, D., Margetts, P., Sivak, J. G., and West-Mays, J. A. (2006). Matrix metalloproteinase inhibitors suppress transforming growth factor-beta-induced subcapsular cataract formation. *American Journal of Pathology* 168, 69-79.

Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J., and Gross, J. (1968). HUMAN SKIN COLLAGENASE . ISOLATION AND MECHANISM OF ATTACK ON COLLAGEN MOLECULE. *Biochimica Et Biophysica Acta* 151, 637-&.

English, W. R., Puente, X. S., Freije, J. M. P., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C., and Murphy, G. (2000). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14046-14055.

Fini, M. E., and Girard, M. T. (1990). THE PATTERN OF METALLOPROTEINASE EXPRESSION BY CORNEAL FIBROBLASTS IS ALTERED BY PASSAGE IN CELL-CULTURE. *Journal of Cell Science* 97, 373-383.

Fini, M. E., Girard, M. T., and Matsubara, M. (1992). COLLAGENOLYTIC GELATINOLYTIC ENZYMES IN CORNEAL WOUND-HEALING. *Acta Ophthalmologica* 70, 26-33.

Fox, P. C. (2007). Autoimmune diseases and Sjogren's syndrome - An autoimmune exocrinopathy. In *Oral-Based Diagnostics*, D. Malamud, and R.S. Niedbala, eds., pp. 15-21.

GomisRuth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., LopezOtin, C., and Bode, W. (1996). The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 angstrom crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *Journal of Molecular Biology* 264, 556-566.

GomisRuth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., *et al.* (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389, 77-81.

Gross, J., and Lapiere, C. M. (1962). COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES - A TISSUE CULTURE ASSAY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1014-&.

Gu, Z. Z., Kaul, M., Yan, B. X., Kridel, S. J., Cui, J. K., Strongin, A., Smith, J. W., Liddington, R. C., and Lipton, S. A. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297, 1186-1190.

Guedez, L., Courtemanch, L., and Stetler-Stevenson, M. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B Cells. *Blood* 92, 1342-1349.

Harper, E., Bloch, K. J., and Gross, J. (1971). ZYMOGEN OF TADPOLE COLLAGENASE. *Biochemistry* 10, 3035-&.

Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., and Shinagawa, A. (1994). CELL GROWTH-PROMOTING ACTIVITY OF TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-2 (TIMP-2). *Journal of Cell Science* 107, 2373-2379.

Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., and Iwata, K. (1992). GROWTH-PROMOTING ACTIVITY OF TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-1 (TIMP-1) FOR A WIDE-RANGE OF CELLS - A POSSIBLE NEW GROWTH-FACTOR IN SERUM. *Febs Letters* 298, 29-32.

Hodgkinson, L. M., Duncan, G., Wang, L. X., Pennington, C. J., Edwards, D. R., and Wormstone, I. M. (2007). MMP and TIMP expression in quiescent, dividing, and differentiating human lens cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, 4192-4199.

Hou, P., Troen, T., Ovejero, M. C., Kirkegaard, T., Andersen, T. L., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Sato, T., Shapiro, S. D., Foged, N. T., and Delaisse, J. M. (2004). Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* 34, 37-47.

Huang, A. J. W., Li, D. Q., Shang, T. Y., and Dursun, D. (2001). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in vascularized and transdifferentiated rabbit corneal epithelia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42, 661.

Imai, K., Ohuchi, E., Aoki, T., Nomura, H., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Research* 56, 2707-2710.

Jiang, Y. F., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-2252.

Karai, I., Matsumura, S., Takise, S., Horiguchi, S., and Matsuda, M. (1984). MORPHOLOGICAL CHANGE IN THE CORNEAL ENDOTHELIUM DUE TO ULTRAVIOLET-RADIATION IN WELDERS. *British Journal of Ophthalmology* 68, 544-548.

Klisovic, D. D., O'Dorisio, A. S., Katz, S. E., Sall, J. W., Balster, D., O'Dorisio, T. M., Craig, E., and Lubow, M. (2001). Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42, 2193-2201.

Knauper, V., Murphy, G., and Tschesche, H. (1996). Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *European Journal of Biochemistry* 235, 187-191.

Kozak, I., Klisenbauer, D., and Juhas, T. (2003). UV-B induced production of MMP-2 and MMP-9 in human corneal cells. *Physiological Research* 52, 229-234.

Kuffova, L., Holan, V., Lumsden, L., Forrester, J. V., and Flipeš, M. (1999). Cell subpopulations in failed human corneal grafts. *British Journal of Ophthalmology* 83, 1364-1369.

Kure, T., Chang, J. H., Kato, T., Hernandez-Quintela, E., Ye, H. Q., Lu, P. C. S., Matrisian, L. M., Gatinel, D., Shapiro, S., Gosheh, F., and Azar, D. T. (2003). Corneal neovascularization after excimer keratectomy wounds in matrilysin-deficient mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 137-144.

Kwan, J. A., Schulze, C. J., Wang, W. J., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D. E., Sawicki, G., and Schulz, R. (2004). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB Journal* 18, 690+.

- Lan, J., Kumar, R. K., Di Girolamo, N., McCluskey, P., and Wakefield, D. (2003). Expression and distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the human iris and ciliary body. *British Journal of Ophthalmology* 87, 208-211.
- Li, D. Q., Lokeshwar, B. L., Solomon, A., Monroy, D., Ji, Z. G., and Pflugfelder, S. C. (2001). Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 73, 449-459.
- Li, D. Q., Shang, T. Y., Kim, H. S., Solomon, A., Lokeshwar, B. L., and Pflugfelder, S. C. (2003). Regulated expression of collagenases MMP-1,-8, and-13 and stromelysins MMP-3,-10, and-11 by human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 2928-2936.
- Li, G. Y., Fridman, R., and Kim, H. R. C. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Research* 59, 6267-6275.
- Li, J. H., Wang, N. L., and Wang, J. J. (2008). Expression of matrix metalloproteinases of human lens epithelial cells in the cultured lens capsule bag. *Eye* 22, 439-444.
- Limb, G. A., Matter, K., Murphy, G., Cambrey, A. D., Bishop, P. N., Morris, G. E., and Khaw, P. T. (2005). Matrix metal loproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *American Journal of Pathology* 166, 1555-1563.
- Lu, P. C. S., Ye, H. Q., Maeda, M., and Azar, D. T. (1999). Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40, 20-27.
- Luo, D. C., Mari, B., Stoll, I., and Anglard, P. (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25527-25536.
- Luparello, C., Avanzato, G., Carella, C., and Pucci-Minafra, I. (1999). Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 54, 235-244.
- Lyu, J., and Joo, C. K. (2005). Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing. *Journal of Biological Chemistry* 280, 21653-21660.
- Malloch, E. L., Perry, K. J., Fukui, L., Johnson, V. R., Wever, J., Beck, C. W., King, M. W., and Henry, J. J. (2009). Gene Expression Profiles of Lens Regeneration and Development in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 238, 2340-2356.
- Malone, J. D., Richards, M., and Jeffrey, J. J. (1991). RECRUITMENT OF PERIPHERAL MONONUCLEAR-CELLS BY MAMMALIAN COLLAGENASE DIGESTS OF TYPE-I COLLAGEN. *Matrix* 11, 289-295.
- Marchenko, N. D., Marchenko, G. N., Weinreb, R. N., Lindsey, J. D., Kyshtoobayeva, A., Crawford, H. C., and Strongin, A. Y. (2004). beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 942-956.
- Matsubara, M., Girard, M. T., Kublin, C. L., Cintron, C., and Fini, M. E. (1991). DIFFERENTIAL ROLES FOR 2 GELATINOLYTIC ENZYMES OF THE MATRIX METALLOPROTEINASE FAMILY IN THE REMODELING CORNEA. *Developmental Biology* 147, 425-439.

McCawley, L. J., and Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 13, 534-540.

Mitchell, B. M., Wu, T. G., Chong, E. M., Pate, J. C., and Wilhelmus, K. R. (2007). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in experimental corneal injury and fungal keratitis. *Cornea* 26, 589-593.

Mulholland, B., Tuft, S. J., and Khaw, P. T. (2005). Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. *Eye* 19, 584-588.

Murphy, G. (1995). Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 66, 55-60.

Murphy, G., Segain, J. P., O Shea, M., Cockett, M., Ioannou, C., Lefebvre, O., Chambon, P., and Basset, P. (1993). THE 28-KDA N-TERMINAL DOMAIN OF MOUSE STROMELYSIN-3 HAS THE GENERAL-PROPERTIES OF A WEAK METALLOPROTEINASE. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15435-15441.

Nagase, H., Enghild, J. J., Suzuki, K., and Salvesen, G. (1990). STEPWISE ACTIVATION MECHANISMS OF THE PRECURSOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (STROMELYSIN) BY PROTEINASES AND (4-AMINOPHENYL)MERCURIC ACETATE. *Biochemistry* 29, 5783-5789.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, 562-573.

Nagase, H., and Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21491-21494.

Ng, J., Coroneo, M. T., Wakefield, D., and Di Girolamo, N. (2008). Ultraviolet Radiation and the Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Ocular Surface Squamous Neoplasia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49, 5295-5306.

O'Brien, T. P., Li, Q. J., Sauerburger, F., Reviglio, V. E., Rana, T., and Ashraf, M. F. (2001). The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use. *Ophthalmology* 108, 656-659.

Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry* 272, 2446-2451.

Ollivier, F. J., Gilger, B. C., Barrie, K. P., Kallberg, M. E., Plummer, C. E., O'Reilly, S., Gelatt, K. N., and Brooks, D. E. (2007). Proteinases of the cornea and preclear tear film. *Veterinary Ophthalmology* 10, 199-206.

Parks, W. C., Wilson, C. L., and Lopez-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 4, 617-629.

Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knauper, V., and Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *Febs Letters* 503, 158-162.

Pei, D. Q., Kang, T. B., and Qi, H. X. (2000). Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33988-33997.

Peppin, G. J., and Weiss, S. J. (1986). ACTIVATION OF THE ENDOGENOUS METALLOPROTEINASE, GELATINASE, BY TRIGGERED HUMAN-NEUTROPHILS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4322-4326.

Ponton, A., Coulombe, B., and Skup, D. (1991). DECREASED EXPRESSION OF TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES IN METASTATIC TUMOR-CELLS LEADING TO INCREASED LEVELS OF COLLAGENASE ACTIVITY. *Cancer Research* 51, 2138-2143.

Remacle, A., Murphy, G., and Roghi, C. (2003). Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *Journal of Cell Science* 116, 3905-3916.

Ringvold, A., and Davanger, M. (1985). CHANGES IN THE RABBIT CORNEAL STROMA CAUSED BY UV-RADIATION. *Acta Ophthalmologica* 63, 601-606.

Ryu, O. H., Fincham, A. G., Hu, C. C., Zhang, C., Qian, Q., Bartlett, J. D., and Simmer, J. P. (1999). Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *Journal of Dental Research* 78, 743-750.

Saarialho-Kere, U., Kerkela, E., Jahkola, T., Suomela, S., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2002). Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *Journal of Investigative Dermatology* 119, 14-21.

Sachdev, N. H., Di Girolamo, N., Nolan, T. M., McCluskey, P., Wakefield, D., and Coroneo, M. T. (2004). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in the human lens: Implications for cortical cataract formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, 4075-4082.

Sadowski, T., Dietrich, S., Muller, M., Havlickova, B., Schunck, M., Proksch, E., Muller, M. S., and Sedlacek, R. (2003). Matrix metalloproteinase-19 expression in normal and diseased skin: Dysregulation by epidermal proliferation. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 989-996.

Salowe, S. P., Marcy, A. I., Cuca, G. C., Smith, C. K., Kopka, I. E., Hagmann, W. K., and Hermes, J. D. (1992). CHARACTERIZATION OF ZINC-BINDING SITES IN HUMAN STROMELYSIN-1 - STOICHIOMETRY OF THE CATALYTIC DOMAIN AND IDENTIFICATION OF A CYSTEINE LIGAND IN THE PROENZYME. *Biochemistry* 31, 4535-4540.

Schein, O. D. (1992). PHOTOTOXICITY AND THE CORNEA. *Journal of the National Medical Association* 84, 579-583.

Sedlacek, R., Mauch, S., Kolb, B., Schatzlein, C., Eibel, H., Peter, H. H., Schmitt, J., and Krawinkel, U. (1998). Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI 1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 198, 408-423.

Sharma, G. D., He, J. C., and Bazan, H. E. P. (2003). p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing - Evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21989-21997.

Shipley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J., and Shapiro, S. D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3942-3946.

Singer, A. J., and Clark, R. A. F. (1999). Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine* 341, 738-746.

Stracke, J. O., Hutton, M., Stewart, M., Pendas, A. M., Smith, B., Lopez-Otin, C., Murphy, G., and Knauper, V. (2000). Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19 - Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14809-14816.

Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Burgess, W. H., Migliorini, M., and Argraves, W. S. (1990). SEQUENCE IDENTITY BETWEEN THE ALPHA-2-MACROGLOBULIN RECEPTOR AND LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN SUGGESTS THAT THIS MOLECULE IS A MULTIFUNCTIONAL RECEPTOR. *Journal of Biological Chemistry* 265, 17401-17404.

Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1995). MECHANISM OF CELL-SURFACE ACTIVATION OF 72-KDA TYPE-IV COLLAGENASE - ISOLATION OF THE ACTIVATED FORM OF THE MEMBRANE METALLOPROTEASE. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5331-5338.

Trivedi, V. D., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. M. (1999). Detection and assay of proteases using calf lens beta-crystallin aggregate as substrate. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 40, 49-55.

Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W. G., and Albini, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *International Journal of Cancer* 75, 246-253.

Vanwart, H. E., and Birkedalhansen, H. (1990). THE CYSTEINE SWITCH - A PRINCIPLE OF REGULATION OF METALLOPROTEINASE ACTIVITY WITH POTENTIAL APPLICABILITY TO THE ENTIRE MATRIX METALLOPROTEINASE GENE FAMILY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5578-5582.

Velasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Knauper, V., Murphy, G., and Lopez-Otin, C. (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4570-4576.

Wang, Y. H., Johnson, A. R., Ye, Q. Z., and Dyer, R. D. (1999). Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33043-33049.

Woessner, J. F. (1991). MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN CONNECTIVE-TISSUE REMODELING. *Faseb Journal* 5, 2145-2154.

Wormstone, I. M., Tamiya, S., Anderson, I., and Duncan, G. (2002). TGF-beta 2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43, 2301-2308.

Xue, M. L., Wakefield, D., Willcox, M. D. P., Lloyd, A. R., Di Girolamo, N., Cole, N., and Thakur, A. (2003). Regulation of MMPs and TIMPs by IL-1 beta during corneal ulceration and infection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 2020-2025.

Yang, M. Z., and Kurkinen, M. (1998). Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts - CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17893-17900.

Yang, Y. N., Bauer, D., Wasmuth, S., Steuhl, K. P., and Heiligenhaus, A. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and 2) during the course of experimental necrotizing herpetic keratitis. *Experimental Eye Research* 77, 227-237.

Ye, H. Q. Q., and Azar, D. T. (1998). Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39, 913-921.

Ye, H. Q. Q., Maeda, M., Yu, F. S. X., and Azar, D. T. (2000). Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41, 2894-2899.

Zhao, H. R., Bernardo, M. M., Osenkowski, P., Sohail, A., Pei, D. Q., Nagase, H., Kashiwagi, M., Soloway, P. D., DeClerck, Y. A., and Fridman, R. (2004). Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8592-8601.

JUNQUEIRA L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (1992). *Základy histologie*. H&H. str. 448-449, 452-453. ISBN 80-85787-37-7