

Metaloproteiny macierzy oraz ich inhibitory a wrzodzące zapalenie rogówki u zwierząt

Tomasz Maślanka

z Zespołu Farmakologii Katedry Patologii i Farmakologii, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the context of ulcerative keratitis in animals. Maślanka T., Division of Pharmacology, Department of Pathology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Olsztyn.

Ulcerative keratitis is a common condition in small animals and horses. While many corneal ulcers are superficial and heal without incident, keratomalacia or corneal “melting” can develop under certain circumstances causing corneal rupture and iris prolapse. Keratomalacia is the result of rapid proteolytic degradation of the corneal stroma. The primary mediators of corneal stromal degeneration are proteinases derived from exogenous sources (bacteria and fungi) and endogenous sources (neutrophils and corneal cells). The important family of enzymes that affect the cornea are the matrix metalloproteinases (MMPs). They can be divided into four classes on the basis of their preferred substrate: collagenases, gelatinases, stromelysins, and membrane type (MT-MMPs). The matrix metalloproteinases perform important physiologic functions in normal tissues, such as remodeling of the corneal stroma. Activities of proteolytic MMPs are normally balanced by natural protease inhibitors, thus preventing excessive degradation of normal healthy tissue. Corneal destruction occurs when the balance between MMPs and their inhibitors is upset in favor of the proteases. The ulcerative keratitis in particular with progressive melting requires vigorous topical therapy, ie, appropriate broad-spectrum antibiotics, atropine, and proteases inhibitors. The proteases inhibitors that can be used include autologous serum, acetylcysteine, tetracyclines (oxytetracycline, doxycycline), disodium versenate, galardin and heparin. However, the overall efficacy of proteases inhibitors in corneal ulcers in the animals is questionable.

Keywords: matrix metalloproteinases, ulcerative keratitis, proteases inhibitors, small animals, horses.

Wrzodzące zapalenie rogówki (*ulcerative keratitis*) wydaje się jedną z najczęściej spotykanych jednostek chorobowych w okulistyce weterynaryjnej. Psy, koty oraz konie są tymi gatunkami zwierząt, u których lekarz weterynarii szczególnie często styka się z tym problemem okulistycznym (1, 2, 3). Powierzchnowe (utrata pełnej grubości nabłonka przedniego), niezakażone wrzody rogówki goją się zwykle stosunkowo szybko i bez komplikacji. Inaczej jest w przypadku wrzodów głębokich, zwłaszcza o charakterze postępującym, gdyż zawsze stanowią one poważne niebezpieczeństwo dla gałki ocznej oraz grożą utratą wzroku. Powikłaniem tego typu wrzodów może być m.in. perforacja rogówki, zapalenie wnętrza gałki ocznej i jaskra. Ponadto w wyniku bliznowacenia rogówki bądź zrostów przednich może

dojść do znacznego upośledzenia sprawności widzenia (1).

Szczególnie groźną odmianę wrzodzącego zapalenia rogówki stanowią szybko postępujące wrzody z objawami jej rozplywu. Wrzody tego typu określa się mianem stępujących się lub rozplywnych (*melting ulcers*). Innym określeniem tego stanu jest rozmiękanie rogówki, czyli keratomalacja (1, 2, 3, 4). Stępujące się wrzody rogówki wymagają podjęcia natychmiastowego, intensywnego leczenia farmakologicznego, gdyż w okulistyce uważane są za stan krytyczny, grozący perforacją rogówki i wtórnym wypadnięciem tęczówki. W przypadku niepodjęcia leczenia może to nastąpić nawet w tak krótkim czasie, jak 24 godziny (1, 2, 3, 4). Farmakoterapia tej jednostki chorobowej obejmuje stosowanie miejscowe i niekiedy

ogólne chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych o szerokim zakresie działania oraz miejscowe podawanie atropiny. Trzecią grupą leków, którą powszechnie zaleca się w leczeniu stępujących się wrzodów rogówki są inhibitory proteinaz, albowiem keratomalacja jest wynikiem szybko postępującej, proteolitycznej degradacji zrębu rogówki (1, 2, 3, 4, 5). Czynnikiem odpowiedzialnym za tę degradację są proteinazy, które mogą mieć pochodzenie egzogenne i endogenne (6, 7, 8, 9, 10). Źródłem enzymów egzogennych są mikroorganizmy bakteryjne i grzybicze. Do patogenów bakteryjnych, którym przypisuje się zdolność wytwarzania proteinaz odgrywających rolę w patogenezie stępujących się wrzodów rogówki, należy przede wszystkim *Pseudomonas spp.*, ale również *Staphylococcus spp.* i *Streptococcus spp.* (11, 12, 13, 14, 15). Spośród grzybów właściwość taką wykazują *Aspergillus* i *Fusarium* (6, 7, 11, 15). Z kolei endogennym źródłem proteinaz są uszkodzone komórki nabłonka rogówki, keratocyty, granulocyty obojętnochłonne i makrofagi (1, 5, 9, 10). Proteinazy rozkładając kolagen, proteoglikany i inne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej powodują szybką destrukcję zrębu rogówki (1, 2, 3, 5). Enzymy proteolityczne, które wywierają tego typu działanie na rogówkę należą do dwóch grup: metaloproteinaz macierzy (*matrix metalloproteinases* – MMPs) i proteinaz serynowych, np. elastaza neutrofilii (16, 17, 18, 19).

Metaloproteiny macierzy – charakterystyka ogólna

Metaloproteiny macierzy to grupa co najmniej 25 strukturalnie i czynnościowo podobnych enzymów proteolitycznych, zależnych od Zn^{2+} i należących do rodziny endoproteinaz. Są syntetyzowane przez wiele typów komórek, m.in. przez fibroblasty, makrofagi i komórki nabłonkowe (20, 21). MMPs to enzymy o dobrze poznanym, wielkim znaczeniu w fizjologii i patologii. Ich podstawową funkcją jest przebudowa (*remodeling*) środowiska zewnątrzkomórkowego poprzez proteolizę białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM), receptorów błonowych i cytokin. W warunkach fizjologicznych metaloproteiny regulują procesy rozwojowe, warunkują homeostazę organizmu a ponadto odgrywają bardzo ważną rolę w procesach gojenia (5, 18). Jednak MMPs są zaangażowane również w liczne procesy patologiczne. Nadmierna aktywacja proteolizy zewnątrzkomórkowej obserwowana w wielu chorobach (np. zapaleniu stawów, zapaleniu ozębnej, owrzo-

zeniach, miażdżycy, chorobach nowotworowych) jest wiązana z zaburzeniem regulacji aktywności MMPs (5).

Metaloproteiny macierzy cechują się tym, że: a) wykazują zdolność do degradacji przynajmniej jednego ze składników macierzy; b) ich aktywne centrum stanowi Zn^{2+} , który spełnia rolę katalityczną i strukturalną; c) syntetyzowane są w komórkach jako preproenzymy, a następnie uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako proenzymy, gdzie ulegają aktywacji przez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu; d) inaktywowane są przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs; 5).

Ze względu na swoistość w stosunku do substratów MMPs można podzielić na cztery grupy. Pierwszą stanowią kolagenazy (m.in. MMP-1, MMP-8), które swoiście rozszczepiają kolagen, głównie I, II i III typu. Grupa druga to żelatynazy; należą do niej MMP-2 i MMP-9. Enzymy te degradują kolagen typu IV w błonach podstawnych, a ponadto wykazują wysoką aktywność proteolityczną względem kolagenu typów V i VII oraz wobec żelatyn. Trzecią grupę metaloproteinaz stanowią stromielizyny, do których zalicza się MMP-3, MMP-10 i MMP-11. Stromielizyny wykazują większą swoistość substratową niż wcześniej wymienione MMPs, gdyż mogą powodować rozkład takich składników ECM, jak fibronektyna, laminina i proteoglikany, jak również rozkładają kolagen typu IV w błonach podstawnych. Grupa czwarta to metaloproteiny błonowe (membrane type MMPs – MT-MMPs), które cechują się tym, że aktywują niektóre prometaloproteiny (proMMPs), jakkolwiek MT1-MMP i MT2-MMP mogą również degradować niektóre składniki ECM (5).

Aktywność MMPs jest bardzo precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym, przy czym w drugim przypadku polega to na kontroli konwersji proenzymu do jego aktywnej formy albo na hamowaniu już aktywnego enzymu przez TIMPs (5).

Czynniki inicjujące produkcję i uwalnianie proMMPs z komórek nie są jeszcze zbyt dobrze poznane. Niemniej jednak zalicza się do nich m.in. interleukinę-1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworu alfa (tumor necrosis factor- α – TNF- α), śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular-endothelial growth factor – VEGF; 4, 5), a ponadto takie eikozanoidy, jak prostaglandyny D_2 , E_2 i $F_2\alpha$ (4, 13, 18). Z kolei transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor- β – TGF- β) hamuje syntezę MMP-1 i MMP-3 (13).

ProMMPs mogą być aktywowane przez różnego rodzaju związki chemiczne oraz sub-

stancje biologicznie czynne, takie jak np. plazmina (5). Plazminogen pod wpływem tkankowego i urokinazowego aktywatora plazminogenu (tissue plasminogen activator – tPA; urokinase-type plasminogen activator – uPA) ulega rozszczepieniu z uwolnieniem plazminy. Aktywacja proMMPs przez plazminę polega na odszczepieniu cysteiny z fragmentu enzymu związanego z atomem Zn, co prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki i umożliwia proteolityczne odszczepienie fragmentu N-końcowego, w wyniku czego dochodzi do odsłonięcia centrum aktywnego z atomem Zn (22).

ProMMPs mogą być również aktywowane w inny sposób, tj. za pośrednictwem innych metaloproteinaz. Wykazano bowiem, że MMP-3 stymuluje przekształcenie proMMP-9 do MMP-9 (23), natomiast MT1-MMP tworzy kompleks z TIMP-2, czego następstwem jest aktywacja proMMP-2 (5).

Naturalnymi inhibitorami MMPs są TIMPs oraz $\alpha 2$ -makroglobulina. Obecnie poznane są cztery izoformy TIMPs (TIMP-1, -2, -3 i -4). Inhibitory te, regulując czynność MMPs, odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu równowagi między depozycją a degradacją składników macierzy zewnątrzkomórkowej (5). TIMPs mają dwa miejsca wiązania, z których jedno odpowiedzialne jest za hamowanie aktywacji MMPs, natomiast drugie za wiązanie do proMMPs. Każdy z TIMPs jest zdolny do blokowania większości MMPs (24). Mechanizm hamowania aktywacji MMPs polega na zablokowaniu przez TIMP, domeną N-końcową, możliwości odszczepienia przez aktywatory N-końcowego fragmentu MMP, co prowadziłoby do odsłonięcia aktywnego centrum. Ponadto TIMP-2 ma dodatkowo zdolność blokowania MMP-2 i MMP-3, ponieważ może wiązać się z nimi również przez domenę C-końcową (22).

Produkowana przez wątrobę $\alpha 2$ -makroglobulina jest nieswoistym inhibitorem wszystkich MMPs, lecz duże rozmiary tej cząsteczki obniżają jej zdolność do penetracji pozanaczyniowej, co bardzo znacznie ogranicza efekt hamowania MMPs (22).

Znaczenie metaloproteinaz macierzy w fizjologii i patologii rogówki

Aktywność MMPs poddawana była ocenie zarówno w oczach zdrowych, jak i chorych u takich zwierząt, jak myszy (14), szczury (25), króliki (16, 25), psy (26, 27) i konie (2, 4, 28). Wykazano wielokrotnie, że proteiny te odgrywają bardzo ważną rolę w procesach fizjologicznych rogówki, jak również w patogenezie wielu jej chorób (4, 5, 16, 25, 26,

27). Szczególnie istotny udział w procesach przebudowy rogówki wydają się mieć MMP-2 i MMP-9 (16, 25). MMP-2, której ekspresję wykazano w nieuszkodzonym zrębie rogówki, uwalniana jest przez keratocyty (komórki zrębu rogówki typu fibroblastów), których główną funkcją jest produkcja kolagenu (13, 25, 29, 30). Przyjmuje się, że proteinaza ta w rogówce odgrywa rolę „nadzorującą”, tzn. jest aktywowana celem degradacji uszkodzonych (np. w wyniku zużycia) cząsteczek kolagenu (19, 25). Z kolei źródłem MMP-9 są komórki nabłonka rogówki, jak również granulocyty obojętnochłonne (2, 19, 25). W tym miejscu należy zaznaczyć, że stężenia MMP-9 w rogówce nie objętej procesem chorobowym są znacznie mniejsze niż MMP-2 (16).

Uważa się, że MMP-2 i MMP-9 odgrywają bardzo ważną rolę w procesie gojenia ubytków rogówki. Wykazano bowiem znacznie zwiększony poziom aktywnej MMP-2 w zrębie rogówki w przypadku jej zranienia, a stan ten utrzymywał się aż do 7 miesięcy od wygojenia się rogówki (25). Wynika to prawdopodobnie z tego, że w początkowym okresie po wygojeniu rogówka w miejscu uszkodzenia jest nieprzezierna, gdyż ubytek zrębu zostaje wypełniony nowo zsyntetyzowanymi składnikami ECM, które są w wysokim stopniu zdeorganizowane. Dopiero po dłuższym upływie czasu nieprzezierność zmniejsza się wskutek przebudowy zrębu rogówki, w czym aktywny udział mają bracia MMP-2 i MMP-3 (5, 16, 25). Z kolei MMP-9 odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w kontrolowaniu resyn-tezy błony podstawnej nabłonka rogówki (19, 25).

Jak już wspomniano, MMP-2 i MMP-9 uwalniane są do przestrzeni pozakomórkowej jako proMMPs, gdzie aktywowane są przez proteiny serynowe (np. plazminę), jak również przez inne MMPs (13). W przypadku oka dobrze udokumentowano taką rolę dla MMP-3 (31). Sobrin i wsp. (31) stwierdzili wysoką aktywność MMP-3 w filmie tęczowym uzyskanym od ludzi cierpiących na wrzody rogówki oraz wykazali, że proteinaza ta pełni rolę aktywatora proMMP-9. Natomiast obecności MMP-3 nie stwierdzono w próbkach łez uzyskanych z oczu ludzi, które nie były objęte żadnym procesem chorobowym (31). Dane te są zgodne z wynikami wcześniejszymi badań, prowadzonych na hodowlach komórek nabłonkowych rogówki królika (16).

W patogenezie wrzodów rogówki bardzo ważną rolę wydaje się odgrywać aktywacja proMMPs przez enzymy produkowane przez *Pseudomonas aeruginosa* (13, 29, 30). Bakteria ta jest często czynnikiem etiologicznym stających się wrzodów rogówki u zwierząt (1, 3, 4) a swoje działanie wywie-

rać może w sposób bezpośredni i pośredni (13). Wykazano między innymi, że proteinazy produkowane przez *Pseudomonas aeruginosa* (elastaza, proteinaza zasadowa) rozkładają kolagen zrębu (13), jak również aktywują (głównie elastaza, a w mniejszym stopniu proteinaza zasadowa) proMMPs uwolnione z keratocytów, efektem czego jest znaczne spotęgowanie proteolitycznej destrukcji rogówki (13, 29, 30).

Aktywność enzymów proteolitycznych na terenie rogówki jest normalizowana przez lokalnie występujące inhibitory proteinaz. Oprócz TIMPs do inhibitorów tych należą α 2-makroglobulina (32), α 1-antychymotrypsyna (33) i α 1-antyparypsyna (34). Są one produkowane i stale obecne na terenie rogówki, co uniezależnia ją od zaopatrzenia w nie przez układ naczyniowy (32, 33, 34).

W chorobach rogówki przebiegających z jej owrzodzeniem, równowaga między aktywnością proteolityczną a antyproteolityczną jest zakłócona przez zbyt wysoką aktywność proteinaz pochodzenia endogennego, jak i egzogennego. Prowadzi to do wzmożenia degradującego oddziaływania MMPs na kolagen, proteoglikany i inne substancje ECM zrębu rogówki. Następstwem tego jest różnego stopnia uszkodzenie zrębu rogówki, łącznie z jego postępującym rozkładem i szybkim „stapianiem się” (10, 18, 19).

Zmiany w aktywności MMPs stwierdzano u ludzi, jak i u zwierząt z chorobami rogówki. Zwiększone poziomy aktywnej postaci MMP-9 wykazano u ludzi, u których zdiagnozowano wrzód brzeżny rogówki, zapalenie rogówki na tle zakażenia wirusem opryszczki i stożek rogówki (35). Aktywność MMPs była oceniana również w filmie łzowym pochodzącym ze zdrowych oczu koni bądź oczu, w których stwierdzono wrzodziejące zapalenie rogówki (2, 28). Strubbe i wsp. (28) wykazali zwiększoną aktywność MMP-2, MMP-9 i elastazy neutrofilowej w filmie łzowym oczu koni objętych szybko postępującym, wrzodziejącym zapaleniem rogówki. W badaniu tym stwierdzono również istotnie zwiększoną aktywność MMP-2 w próbkach łez pochodzących z oczu zdrowych, ale kontralateralnych względem oczu chorych, w porównaniu do wartości, jakie uzyskano w grupie kontrolnej, tj. w filmie łzowym koni z obydwojnem zdrowych oczu. Autorzy przytaczanych badań zakładają dwie teorie mogące wyjaśniać to zjawisko. W pierwszej proponują uznać je za wynik ogólnoustrojowej reakcji zapalnej związanej z procesem zapalnym toczącym się w rogówce. Druga zakłada możliwość, że chore konie miały naturalnie podwyższoną aktywność MMP-2, co predysponowało je do wystąpienia wrzodziejącego zapalenia rogówki.

Również u psów chorobom rogówki towarzyszy zwiększona aktywność proteinaz. Arican i Ceylan (26) wykazali, że u psów w przebiegu zapalenia spojówek i rogówki znacznie zwiększa się aktywność MMP-9 w filmie łzowym. Również Willeford i wsp. (27) w próbkach filmu łzowego pobranych od 26 psów chorujących na nawracające nadżerki rogówki w 20 przypadkach stwierdzili zwiększoną aktywność proteinaz.

Warto również wspomnieć, że MMPs przypisuje się istotny udział w procesie neowaskularyzacji rogówki, co raczej nie dziwi, biorąc pod uwagę ich ważną rolę w regulacji angiogenezy (5). Wykazano bowiem zwiększoną ekspresją VEGF i MMP-2 na terenie zrębu oraz rąbka rogówki w trakcie jej neowaskularyzacji (36). Wiadomo, że VEGF stymuluje komórki śródbłonka do produkcji MMPs, które jako jedyne trawią kolagen typu IV stanowiący szkielet błony podstawnej naczyń. Uszkodzenie tej błony jest nieodzownym warunkiem umożliwiającym migrację komórek śródbłonka do przyległej ECM, gdzie mogą one proliferować i tworzyć nowe kapilary (5).

Inhibitory proteinaz zalecane w leczeniu wrzodziejącego zapalenia rogówki u zwierząt

Inhibitory proteinaz są powszechnie zalecane w okulistyce weterynaryjnej do leczenia wrzodziejącego zapalenia rogówki (1, 2, 3), choć często podkreśla się, że ich skuteczność w leczeniu tej jednostki chorobowej u zwierząt jest dyskusyjna (3) i nieraz bywa kwestionowana (4). Wyniki badań, w których oceniano efektywność tych leków w hamowaniu aktywności proteinaz (tj. endo- i egzogennych MMPs i proteinaz serynowych) w filmie łzowym lub badano ich wpływ na proces gojenia się ran rogówki często są ze sobą sprzeczne (2, 4, 28, 37, 38, 39, 40, 41).

Aktualnie do najczęściej zalecanych (i również badanych) inhibitorów proteinaz, przeznaczonych do stosowania miejscowego, u małych zwierząt i koni zaliczamy acetylocysteinę, tetracykliny (doksycyklinę i oksytetracyklinę), wersenian dwusodowy, heparynę, galardin (pochodna kwasu hydroksamowego) oraz autologiczną surowicę lub osocze (ze względu na zawartość α 2-makroglobuliny i α 1-antyparypsyny).

Acetylocysteina jest związkiem bogatym w grupy sulfhydrylowe, które wiążą w sposób nieodwracalny jony Zn stanowiące centra aktywne MMPs, w ten sposób unieczynniając je (2). Postuluje się również możliwość hamowania przez ten lek produkcji MMPs na poziomie transkrypcyjnym (42).

Brown i wsp. (38) wykazali, że cysteina i acetylocysteina redukowały owrzodzenia rogówki u królików wywołane oparzeniem substancjami o charakterze zasadowym. Wyniki najnowszych badań wskazują, że 3% acetylocysteina (stosowana do worka spojówkowego) w istotny sposób skraca czas gojenia się doświadczalnie wywołanych urazów rogówki u psów (37). Takiego efektu nie stwierdzono po podaniu leku w stężeniach 10 i 20%. Ponadto w badaniu histopatologicznym nie wykazano toksycznego oddziaływania 3% acetylocysteiny na rogówkę psów (37). Wyniki tych badań są zgodne z tymi, które uzyskał Kanao i wsp. (39). Ci ostatni badacze stwierdzili, że miejscowe stosowanie 3% acetylocysteiny w przebiegu wrzodów rogówki u psów korzystnie wpływało na wyleczalność tych chorób i nie powodowało żadnych działań niepożądanych. Petroustos i wsp. (43) prowadząc badania na królikach wykazali, że 10 i 20% roztwór acetylocysteiny nie wywiera toksycznego wpływu na rany rogówki, jak i nie oddziaływała niekorzystnie na szybkość jej reepitelializacji. Wzmiankowane badania wydają się mieć szczególnie dużą wartość, gdyż są jednymi z nielicznych tego typu, prowadzonych w warunkach *in vivo*, a ponadto oceniają skuteczność kliniczną leku, a nie tylko jego zdolność do hamowania aktywności proteinaz. Jednak wyniki w nich uzyskane stoją w sprzeczności z rezultatami badań prowadzonych na królikach przez Obenberga i Cejkową (40), Fittona i wsp. (44) oraz Thersa i wsp. (41), którzy nie stwierdzili korzystnego wpływu acetylocysteiny na gojenie się ran rogówki. Ponadto wyniki ich badań sugerują, że miejscowe stosowanie acetylocysteiny (szczególnie w dużych stężeniach rzędu 20%) może wywierać toksyczne działanie względem nabłonka rogówki oraz niekorzystnie oddziaływać na warstwę mucynową filmu łzowego. Niemniej jednak spośród inhibitorów proteinaz to właśnie acetylocysteina (w stężeniach od 2 do 10%) wydaje się szczególnie często zalecana w okulistyce weterynaryjnej, zwłaszcza w odniesieniu do małych zwierząt (1, 3, 37, 39, 45), jak również koni (2, 46). W dostępnej literaturze brak danych na temat badań prowadzonych *in vivo*, w których oceniano skuteczność acetylocysteiny bądź innych inhibitorów proteinaz w leczeniu wrzodziejącego zapalenia rogówki u koni. W badaniach *in vitro* Olivier i wsp. (2) wykazali, że 10% roztwór acetylocysteiny skutecznie hamuje aktywność MMPs w filmie łzowym pochodzącym z oczu koni objętych wrzodziejącym zapaleniem rogówki. Również Haffner i wsp. (46), w badaniach na izolowanych rogówkach końskich, eksponowanych na działanie kolagenaz bakteryjnych wyka-

zali, że acetylocysteina (20 mg/ml) zmniejsza o około 50% aktywność tych enzymów. Wyniki tych badań, mimo że nie potwierdzone klinicznie, sugerują potencjalnie korzystny wpływ miejscowego stosowania acetylocysteiny w chorobach rogówki u koni, w których dochodzi do jej proteolitycznej destrukcji (2). Omawiając acetylocysteinę w kontekście zastosowania w okulistyce, warto wspomnieć, że ze względu na swoje mukolityczne właściwości jest ona zalecana u psów jako lek wspomagający w terapii przypadków suchego zapalenia rogówki i spojówki, którym towarzyszy gęsty i lepki wypływ śluzowy (heavy mucus) z worka spojówkowego (45).

Tetracykliny w okulistyce znajdują zastosowanie jako antybiotyki oraz, niezależnie od tego, jako inhibitory proteinaz. Już od dawna było wiadomo, że minocyklina i doksycyklina mogą hamować degradację tkanki łącznej rogówki, skóry i kości wynikającą z jej kolagenolizy (47).

Hamujący wpływ tetracyklin na aktywność MMPs jest prawdopodobnie wielokierunkowy. Główny mechanizm działania wynika z ich zdolności do chelatowania Zn^{2+} i Ca^{2+} , w wyniku czego tworzą one kompleksy z MMPs, redukując w ten sposób ich aktywność enzymatyczną (47). W tym kontekście autorowi pracy nasuwa się pytanie czy fluorochinolony, które również są znane ze swoich chelatujących właściwości wobec dwu- i trójwartościowych kationów, w tym Zn^{2+} (48), mogą wywierać podobne do tetracyklin hamujące działanie na aktywność MMPs? Pytanie to wydaje się o tyle istotne, że w ostatnich latach norfloksacyna, ciprofloksacyna i ofloksacyna zaczęły być używane miejscowo w okulistyce małych zwierząt (1, 3). Podnoszona jest także rola tetracyklin, jako supresorów ekspresji genów niektórych kolagenaz i żelatynaz, a ponadto sugeruje się, że leki te hamują degradację α 1-antytrypsyny (49). Ponadto antyproteinazowe właściwości tetracyklin wynikać mogą również po części z ich działania przeciwzapalnego (4). Wykazano bowiem, że doksycyklina hamowała aktywność enzymatyczną MMPs poprzez oddziaływanie na prozapalnie działającą IL-1 (50). Li i wsp. (50) sugerują, że lek ten redukuje stymulujące działanie IL-1 i TNF- α na produkcję i uwalnianie MMPs z komórek nabłonkowych rogówki człowieka. Z kolei w innych badaniach stwierdzano, że doksycyklina zmniejsza syntezę i bioaktywność IL-1 w hodowlach wyżej wymienionych komórek (51). U ludzi wykazano, że doksycyklina korzystnie wpływała na proces gojenia się nawracających powierzchownych wrzodów rogówki (52), natomiast u królików stwierdzono, że lek ten znacząco zmniejszał aktywność kola-

genaz w filmie łzowym po oparzeniu rogówki zasadami (53). Trzeba jednak zaznaczyć, że w obu przypadkach tetracykliny były podawane ogólnie.

Doksycyklina i tetracyklina (w roztworach 0,1%) zaliczane są do inhibitorów proteinaz przeznaczonych do stosowania miejscowego w leczeniu wrzodziejącego zapalenia rogówki u zwierząt (1, 2, 3). Jednakże, opierając się na dostępnej literaturze, można stwierdzić, że do chwili obecnej brak przekonujących dowodów na temat ich skuteczności klinicznej w leczeniu tej jednostki chorobowej. Niemniej Olivier i wsp. (2) wykazali, że dodanie 0,1% doksycykliny do próbek filmu łzowego, uzyskanego od koni chorujących na wrzodziejące zapalenie rogówki, redukowało w 96,3% łączną aktywność MMP-2 i MMP-9. W innych badaniach Rainbow (4) podawał do worka spojówkowego zdrowych oczu koni oksytetracyklinę 3 razy dziennie przez 5 dni, a po upływie 12 godzin od ostatniego podania pobrał próbki łez i oznaczył w nich aktywność MMP-2 i MMP-9, która nie różniła się istotnie od wartości kontrolnych. Na podstawie tego typu badań trudno jednak mówić o ocenie skuteczności bądź nieskuteczności oksytetracykliny w leczeniu wrzodziejącego zapalenia rogówki, przynajmniej z dwóch względów. Po pierwsze badania były prowadzone na oczach, które nie były objęte procesem chorobowym i jest prawdopodobne, że poziom fizjologicznej produkcji MMP-2 i MMP-9 nie może być zredukowany istotnie inhibitorami proteinaz (4). Po drugie, odstęp czasu między podaniem leku a oznaczeniem aktywności MMP-2 i MMP-9 (wynoszący 12 godzin) wydaje się za długi dla obiektywnego określenia wpływu miejscowo podanej oksytetracykliny na aktywność badanych enzymów. Rainbow (4) nie wyklucza występowania przejściowego (krótszego niż 12 godzin) antyproteinazowego działania oksytetracykliny, które po dłuższym okresie zostaje zahamowane lub całkowicie zniesione w wyniku rozcieńczenia leku przez łzy, jak również przez stałą produkcję MMPs. Aby w pełni wykazać czy tetracykliny mogą hamować aktywność MMPs, celowe wydaje się przeprowadzenie badań, w których leki te stosowane byłby w różnych odstępach czasu, pomiędzy którymi próbki filmu łzowego pobierane byłyby w krótkich i regularnych okresach. Rainbow (4) sugeruje, że jeśli antyproteinazowe działanie tetracyklin stosowanych miejscowo jest tylko krótkotrwałe, to można oczekiwać, że leki te podane ogólnie będą wywierać znacznie dłuższe działanie.

Kolejnym inhibitorem stosowanym w chorobach oczu u ludzi i zwierząt jest wersenian dwusodowy, czyli sól dwusodowa kwasu wersenowego – EDTA (1, 2, 3, 4). Mechanizm dzia-

łania tego związku wynika z jego dużego powinowactwa do Ca^{2+} . Poprzez tworzenie trwałych chelatów z tymi jonami, wersenian dwusodowy działa destabilizująco na MMPs. Uważa się ponadto, że związek ten zmniejsza migrację granulocytów obojętnochłonnych do miejsca wrzodu rogówki oraz hamuje uwalnianie proteinaz przez te komórki (2). Wersenian dwusodowy jest zalecany do stosowania miejscowego (w roztworach 0,2%) w leczeniu wrzodów rogówki, szczególnie w przypadkach, którym towarzyszy zaznaczona jej kolagenoliza, jakkolwiek skuteczność i miejscowa tolerancja na lek pozostają objektem kontrowersji (1, 2, 3). U królików leczenie wrzodów rogówki 0,1% EDTA nie wpływała w istotny sposób na szybkość reepitelializacji (54). W badaniach Oliviera i wsp. (2) wykazano, że 0,2% EDTA dodany do próbek filmu łzowego uzyskanego od koni chorujących na wrzodziejące zapalenie rogówki redukowało w 99,4% łączną aktywność MMP-2 i MMP-9. EDTA stosowany w leczeniu wrzodów rogówki u koni w stężeniach od 0,05 do 0,2% jest uznawany za lek dobrze tolerowany przez tkanki oka. Niemniej jednak długotrwałe stosowanie EDTA może prowadzić do miejscowego niedoboru Ca^{2+} , a w efekcie upośledzać tworzenie się prawidłowych połączeń między komórkami nabłonka rogówki, gdyż proces ten jest zależny od Ca^{2+} (2).

U starych psów cierpiących na owrzodzenie rogówki występujące wtórnie do jej zwyrodnienia związanego z odkładaniem się Ca^{2+} , zalecano miejscowe stosowanie EDTA (cztery razy dziennie), celem zmniejszenia nagromadzenia Ca^{2+} oraz ułatwienia epitelializacji (45).

Autologiczna surowica ze względu na zawartość α 2-makroglobuliny jest również zaliczana do inhibitorów proteinaz. α 2-makroglobulina jest nieswoistym inhibitorem proteinaz o szerokim spektrum działania, gdyż hamuje aktywność wszystkich czterech głównych klas enzymów degradujących pozakomórkową macierz, tj. proteinaz aspartylowej, cysteinowej i serynowej oraz metaloproteinaz macierzy (2). α 2-makroglobulina pod wpływem przyłączonej cząsteczki MMPs zmienia swoją strukturę i zamyka enzym w „klatce” swojej cząsteczki (22). Autologiczną surowicę zaleca się (1-2 krople co 1-2 godziny) jako lek wspomagający w leczeniu wrzodów rogówki u małych zwierząt i koni (1, 2, 3). Wykazano (2), że dodanie nierozcieńczonej surowicy końskiej do próbek filmu łzowego koni chorujących na wrzodziejące zapalenie rogówki zahamowało w 90% łączną aktywność MMP-2 i MMP-9. Haffner i wsp. (46), prowadząc badania na izolowanych rogówkach końskich eksponowanych na działanie kolagenaz bakteryjnych, wykazali, że surowica krwi hamuje

w około 50% aktywność tych enzymów. Podobny efekt zaobserwowano po zastosowaniu antytoksyny tężcowej (46).

Galardin (pochodna kwasu hydroksamowego), znany również jako ilomostat, jest syntetycznym inhibitorem MMPs. Wydaje się on dość obiecującym lekiem w leczeniu szybko postępującej degradacji zrębu rogówki, w tym również w przypadkach, gdy u podłoża tego leży zakażenie *Pseudomonas aeruginosa*.

Wyniki badań prowadzonych przez Hao i wsp. (13) wykazały, że galardin istotnie hamował degradację kolagenu eksponowanego na działanie *Pseudomonas aeruginosa* w obecności bądź nieobecności keratocytów, przy czym w tym drugim przypadku było to szczególnie silnie zaznaczone. Rezultaty uzyskane w tym doświadczeniu sugerują, że efektem zahamowania przez galardin aktywności proteinaz wytworzonych przez *Pseudomonas aeruginosa* jest nie tylko zniesienie ich bezpośredniego kolagenolitycznego działania, ale również zapobieganie przekształceniu proMMPs uwalnianych przez keratocyty do ich aktywnych form. Jest to zgodne z odkryciami Matsumoto i wsp. (29, 30), którzy wykazali, że proteinazy *Pseudomonas aeruginosa* aktywują proMMPs uwalniane przez keratocyty. Niemniej galardin jest również zdolny do hamowania aktywnych MMPs, jak i do zapobiegania aktywacji proMMPs pochodzących z keratocytów, niezależnie od obecności *Pseudomonas aeruginosa* (55). W próbkach filmu łzowego pobranych od koni chorujących na wrzodziejące zapalenie rogówki 0,2% ilomostat hamował w 98,9% całkowitą aktywność MMP-2 i MMP-9 (zarówno aktywnych metaloproteinaz, jak i ich proenzymów; 2). W badaniach modelowych przeprowadzonych na królikach stwierdzono, że miejscowe stosowanie galardinu hamowało destrukcję rogówki po śródzrębowej iniekcji hodowli *Pseudomonas aeruginosa* (56), jak również zapobiegało owrzodzeniu rogówki po jej oparzeniu substancjami o odczynie zasadowym (57). Ollivier (1, 2) zalicza galardin do tych inhibitorów proteinaz, które mogą być użyte z korzyścią w leczeniu wrzodów rogówki u małych zwierząt i koni.

Sugeruje się, że innymi inhibitorami proteinaz, oprócz omówionych, które mogłyby być użyte w leczeniu wrzodów rogówki u psów są: heparyna, askorbinian sodu, cytrynian sodu, penicylamina i bacytracyna (3). Jednakże w dostępnej literaturze brak rzetelnych danych dotyczących badań i zastosowania tych związków w kontekście wrzodziejącego zapalenia rogówki.

W świetle dostępnych danych wydaje się, że acetylocysteina i surowica są tymi inhibi-

torami proteinaz, które obecnie znajdują najczęstsze zastosowanie kliniczne (3).

Podsumowując trzeba zaznaczyć, że związki hamujące funkcję MMPs oraz innych proteinaz to dziś olbrzymia, dynamicznie rozwijająca się grupa leków, a omówione substancje stanowią tylko jej margines. Poznanie ważnej roli MMPs w procesach patologicznych i fizjologicznych organizmu, przyczyniło się do podjęcia badań znanych już leków pod kątem ich zdolności do hamowania aktywności metaloproteinaz bądź też do poszukiwania nowych substancji o takich właściwościach. Wydaje się, że poszukiwania te nabrały szczególnego tempa, gdy zrozumiano olbrzymie znaczenie MMPs w przerzutowaniu nowotworów. Należy jednak zaznaczyć, że aktualnie terapia antyproteinazowa znajduje się na etapie prób klinicznych.

W przedstawionym artykule omówiono tylko te inhibitory proteinaz, które obecnie są zalecane do miejscowego leczenia wrzodziejącego zapalenia rogówki u małych zwierząt i koni. Biorąc jednak pod uwagę duże znaczenie MMPs w patogenezie chorób rogówki oraz innych struktur przedniego odcinka oka (5), można przypuszczać, że w przyszłości zostaną podjęte badania nad wykorzystaniem do ich leczenia innych związków mogących modyfikować czynności MMPs.

Piśmiennictwo

- Ollivier F.J.: Bacterial corneal diseases in dogs and cats. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2003, **18**, 193–198.
- Ollivier F.J., Brooks D.E., Kallberg M.E., Komaromy A.M., Lassaline M.E., Andrew S.E., Gelatt K.N., Stevens G.R., Blalock T.D., Setten G.B., Schultz G.S.: Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. *Am. J. Vet. Res.* 2003, **64**, 1081–1087.
- Whitley R.D.: Canine and feline primary ocular bacterial infections. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 2000, **30**, 1151–1167.
- Rainbow M.E.: Effects of systemic flunixin meglumine, topical oxytetracycline, and topical prednisolone acetate on tear film proteinases in normal horses. Master's Thesis 2004. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, April 22, 2004, Blacksburg, Virginia, USA.
- Wong T.T., Sethi C., Daniels J.T., Limb G.A., Murphy G., Khaw P.T.: Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv. Ophthalmol.* 2002, **47**, 239–256.
- Ball M.A.: Equine fungal keratitis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 2000, **22**, 182–186.
- Brooks D.E., Andrew S.E., Dillavou C.L., Ellis G., Kubilis P.S.: Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis. *Am. J. Vet. Res.* 1998, **59**, 138–142.
- Gaarder J.E., Rebhun W.C., Ball M.A., Patten V., Shin S., Erb H.: Clinical appearances, healing patterns, risk factors, and outcomes of horses with fungal keratitis: 53 cases (1978–1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, **213**, 105–112.
- Gordon J.M., Bauer E.A., Eisen A.Z.: Collagenase in human cornea: immunologic localization. *Arch. Ophthalmol.* 1980, **98**, 341–345.

- Slansky H.H., Gnadinger M.C., Itoi M., Dohlman C.H.: Collagenase in corneal ulcerations. *Arch. Ophthalmol.* 1969, **82**, 108–111.
- Chmielewski N.T., Brooks D.E., Smith P.J., Hendrix D.V., Whittaker C., Gelatt K.N.: Visual outcome and ocular survival following iris prolapse in the horse: a review of 32 cases. *Equine Vet. J.* 1997, **29**, 31–39.
- Brooks D.E., Andrew S.E., Biros D.J., Denis H.M., Cutler T.J., Strubbe D.T., Gelatt K.N.: Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses. *Vet. Ophthalmol.* 2000, **3**, 121–125.
- Hao J.L., Nagano T., Nakamura M., Kumagai N., Mishima H., Nishida T.: Effect of galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp. Eye Res.* 1999, **69**, 595–601.
- Kawaharajo K., Homma J.Y.: Pathogenesis of the mouse keratitis produced with *Pseudomonas aeruginosa*. *Jap. J. Exp. Med.* 1975, **45**, 515–524.
- Wolf E.D.: Medical treatment for corneal ulcers. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* 1990, **36**, 161–169.
- Fini M.E., Girard M.T.: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990, **31**, 1779–1788.
- Fini M.E., Girard M.T., Matsubara M.: Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol.* 1992, **202** (Suppl.), 26–33.
- Fini M.E., Cook J.R., Mohan R.: Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch. Dermatol. Res.* 1998, **290** (Suppl.), S12–S23.
- Matsubara M., Girard M.T., Kublin C.L., Cintron C., Fini M.E.: Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. *Dev. Biol.* 1991, **147**, 425–439.
- Bode W., Maskos K.: Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol. Chem.* 2003, **385**, 863–872.
- Brinckerhoff C.E., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002, **3**, 207–214.
- Kolomecki K.: Hamowanie funkcji metaloproteinaz – możliwości zastosowania klinicznego. *Onkol. Pol.* 2000, **3**, 163–167.
- Ogata Y., Enghild J.J., Nagase H.: Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**, 3581–3584.
- Brew K., Dinakarpanian D., Nagase H.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem. Biophys. Acta* 2000, **1477**, 267–83.
- Fini M.E., Yue B.Y., Sugar J.: Collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases in normal and keratoconus corneas. *Curr. Eye Res.* 1992, **11**, 849–862.
- Arican M., Ceylan C.: Metalloproteinases in canine experimental traumatic keratoconjunctivitis. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 1999, **46**, 527–532.
- Willeford K.O., Miller W.W., Abrams K.L., Vaughn B.M.: Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs. *Vet. Ophthalmol.* 1998, **1**, 5–8.
- Strubbe D.T., Brooks D.E., Schultz G.S., Willis-Goulet H., Gelatt K.N., Andrew S.E., Kallberg M.E., MacKay E.O., Collante W.R.: Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Vet. Ophthalmol.* 2000, **3**, 111–119.
- Matsumoto K., Shams N.B., Hanninen L.A., Kenyon K.R.: Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteinase by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Curr. Eye Res.* 1992, **11**, 1105–1109.
- Matsumoto K., Shams N.B., Hanninen L.A., Kenyon K.R.: Cleavage and activation of corneal matrix metalloproteinases by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993, **34**, 1945–1953.
- Sobrin L., Liu Z., Monroy D.C., Solomon A., Selzer M.G., Lokeshwar B.L., Pflugfelder S.C.: Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, **41**, 1703–1709.
- Twining S.S., Fukuchi T., Yue B.Y., Wilson P.M., Zhou X., Loushin G.: Alpha 2-macroglobulin is present in

- and synthesized by the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994, **35**, 3226–3233.
33. Twining S.S., Fukuchi T., Yue B.Y., Wilson P.M., Zhou X.: Alpha 1-antichymotrypsin is present in and synthesized by the cornea. *Curr. Eye Res.* 1994, **13**, 433–439.
 34. Twining S.S., Fukuchi T., Yue B.Y., Wilson P.M., Boskovic G.: Corneal synthesis of alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-antitrypsin). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994, **35**, 458–462.
 35. Smith V.A., Rishmawi H., Hussein H., Easty D.L.: Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br. J. Ophthalmol.* 2001, **85**, 147–153.
 36. Kvant A., Sarman S., Fagerholm P.: Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 2000, **70**, 419–428.
 37. Aldavood S.J., Behyar R., Sarchahi A.A., Rad M.A., No-roozian I., Ghamsari S.M., Sadeghi-Hashjin G.: Effect of acetylcysteine on experimental corneal wounds in dogs. *Ophthalmic Res.* 2003, **35**, 319–323.
 38. Brown S.I., Akia S., Weller C.A.: Prevention of the ulcers of the alkali-burned cornea: Preliminary studies with collagenase inhibitors. *Arch. Ophthalmol.* 1969, **82**, 95–97.
 39. Kanao S., Kouzuki S., Isuneno M., Enomoto H., Yasuhiro K., Yamane Y.: Clinical application of 3% N-acetylcysteine eye drops in corneal diseases in dogs. *J. Japan. Vet. Med. Assoc.* 1993, **46**, 488–491.
 40. Obenberger J., Cejkova J.: Corneal damage following intracorneal injection of N-acetyl-L-cysteine. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 1972, **185**, 171–176.
 41. Thermes F., Molon-Noblott S., Grove J.: Effects of acetylcysteine on rabbit conjunctival and corneal surfaces. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1991, **32**, 2958–2963.
 42. Galis Z.S., Asanuma K., Godin D., Meng X.: N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? *Circulation* 1998, **97**, 2445–2453.
 43. Petroustos G., Guimaraes R., Giraud J.P., Renard G., Pouliquen Y.: Effect of acetylcysteine (Mucomyst) on epithelial wound healing. *Ophthalmic. Res.* 1982, **14**, 241–248.
 44. Fitton J.H., Ziegelaar B.W., Hicks C.R., Clayton A.B., Crawford G.J., Constable I.J., Chirila T.V.: Assessment of anticollagenase treatments after insertion of a keratoprosthesis material in rabbit cornea. *Cornea* 1998, **17**, 108–114.
 45. Glaze M.B.: Ophthalmic disease and its management. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1997, **27**, 1505–1522.
 46. Haffner J.C., Fecteau K.A., Eiler H.: Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine. *Vet. Ophthalmol.* 2003, **6**, 67–72.
 47. Golub L.M., Ramamurthy N., McNamara T.F., Gomes B., Wolff M., Casino A., Kapoor A., Zambon J., Ciancio S., Schneir M.: Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 1984, **19**, 651–655.
 48. Lomaestro B.M., Bailie G.R.: Absorption interactions with fluoroquinolones. 1995 update. *Drug Saf.* 1995, **12**, 314–333.
 49. Ralph R.A.: Tetracyclines and the treatment of corneal stromal ulceration: a review. *Cornea* 2000, **19**, 274–277.
 50. Li D. Q., Lokeshwar B.L., Solomon A., Solomon A., Monroy D., Ji Z., Pflugfelder S.C.: Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 2001, **73**, 449–459.
 51. Solomon A., Rosenblatt M., Li D. Q., Liu Z., Monroy D., Ji Z., Lokeshwar B.L., Pflugfelder S.C.: Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, **41**, 2544–2557.
 52. Dursun D., Kim M.C., Solomon A., Pflugfelder S.C.: Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids. *Am. J. Ophthalmol.* 2001, **132**, 8–13.
 53. Perry H.D., Hodes L.W., Seedor J.A., Donnenfeld E.D., McNamara T.F., Golub L.M.: Effect of doxycycline hyclate on corneal epithelial wound healing in the rabbit alkali-burn model. Preliminary observations. *Cornea* 1993, **12**, 379–382.
 54. Schultz G.S.: Modulation of corneal wound healing. W: Cornea, pod red. Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J., Mosby Year Book Inc, St Louis 1997, s. 183–196.
 55. Hao J.L., Nagano T., Nakamura M., Kumagai N., Mishima H., Nishida T.: Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. *Exp. Eye Res.* 1999, **68**, 565–572.
 56. Barletta J.P., Angella G., Balch K.C., Dimova H.G., Stern G.A., Moser M.T., van Setten G.B., Schultz G.S.: Inhibition of pseudomonal ulceration in rabbit corneas by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, **37**, 20–28.
 57. Schultz G.S., Strelow S., Stern G.A., Chegini N., Grant M.B., Galardy R.E., Grobelny D., Rowsey J.J., Stonecipher K., Parmley V.: Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992, **33**, 3325–3331.

Lekarz wet. T. Maślanka, Zespół Farmakologii Katedry Patologii i Farmakologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn, e-mail: tomasz.maslanka@uwm.edu.pl