

Univerzita Karlova 2. lékařská fakulta



Dizertační práce

**Identifikace a stanovení metaloproteinů a
metaloproteináz v experimentálních modelech a
v souborech pacientů**

Ing. Jiří Kukačka

Školitel: Prof.MUDr. Richard Průša, CSc.

**Ústav klinické biochemie a patobiochemie
UK 2.LF a FN Motol**

Praha 2007

OBSAH

1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ZNALOSTÍ	9
1.1. Vlastnosti metaloproteinů a jejich klasifikace	9
1.1.1 Úvod	9
1.1.2 Struktura, vlastnosti a funkce metaloproteinů spojených se zinkem	10
1.1.2.1. Zn-enzymy	10
1.1.2.1.1. SKUPINA ZINEK DEPENDENTNÍCH METALOPROTEINÁZ	12
1.1.2.1.1.1. Struktura a rozdělení zinek dependentních metaloproteináz	12
1.1.2.1.1.2. Přehled biologických funkcí vybraných Zn –metaloproteináz u člověka.	14
1.1.2.2. Neenzymové metaloproteiny obsahující zinek	20
1.1.2.2.1. Proteiny pro distribuci zinku	20
1.1.2.2.2. Metalothioneiny	22
1.2. Matrixové metaloproteinázy a jejich úloha ve vybraných patologických procesech a klinických stavech	27
1.2.1 Úvod	27
1.2.2 Struktura matrixových metaloproteináz	30
1.2.3 Mechanismus účinku a substrátová specifita MMP	32
1.2.3.1. Kolagenázy	33
1.2.3.2. Želatinázy	34
1.2.3.3. Stromelysiny	34
1.2.3.4. Makrofágová elastáza a ostatní MMP	34
1.2.4 Aktivace a inhibice matrixových metaloproteináz	35
1.2.4.1. Regulace MMP na úrovni genové exprese	35
1.2.4.2. Regulace enzymové aktivity MMP mechanismem cysteinového sepnutí	36
1.2.4.3. Inhibice MMP prostřednictvím TIMP	38
1.2.5 Matrixové metaloproteinázy a onemocnění myokardu	40
1.2.5.1. Struktura a funkce ECM myokardu	40
1.2.5.2. Úloha MMP v ischemické srdeční tkáni	41
1.2.5.3. Funkce MMP v remodelaci hypertrofické srdeční tkáně	43
1.2.5.4. MMP a dilatační kardiomyopatie	43
1.2.5.5. Syntetické inhibitory MMP a možnosti terapie kardiomyopatií	44
1.2.5.5.1. Peptidomimetické inhibitory MMP	46
1.2.5.5.2. Nepeptidomimetické inhibitory MMP	46
1.2.5.5.3. Deriváty tetracyklínů	49
1.2.5.5.4. Bifosfonáty	49
1.2.6 Matrixové metaloproteinázy a ateroskleróza	49
1.2.6.1. Využití matrixových metaloproteináz v klinicko-biochemické diagnostice hyperlipidemií a aterosklerózy	51
1.2.7 Matrixové metaloproteinázy v klinicko-biochemické diagnostice kraniocerebrálního poranění	52

1.3.	Metalothionein - jeho role v některých fyziologických a patologických procesech	54
1.3.1	Metalothionein a chronické intoxikace	55
1.3.2	Metalothionein a CNS	56
2.	CÍLE PRÁCE	58
3.	METODY	59
3.1.	Experimentální modely	59
3.1.1	Expozice laboratorního potkana 4denní hypoxii a 4denní hypoxii s hyperkapnií.....	59
3.1.2	Expozice laboratorního potkana 3týdenní hypoxii za současného podávání inhibitoru batimastat	60
3.1.3	Dlouhodobá aplikace metamfetaminu laboratornímu potkanovi.....	61
3.2.	Soubory pacientů.....	62
3.2.1	Soubor pacientů s poruchou lipidového metabolismu.....	62
3.2.2	Soubor pacientů s traumatickým poškozením mozku.....	62
3.3.	Laboratorní metody.....	63
3.3.1	Izolace proteinů ze srdeční tkáně – proteinová profilace	63
3.3.2	Stanovení celkové koncentrace bílkoviny ve frakcích	63
3.3.3	Stanovení celkového 4-hydroxyprolinu ve tkáni.....	64
3.3.4	Stanovení koncentrace 4-hydroxyprolinu ve frakci proteinů extracelulární matrix.....	64
3.3.5	Elektroforéza kolagenních proteinů	64
3.3.6	Extrakce celkové RNA ze srdeční tkáně.....	65
3.3.7	Elektroforéza, northern blot a hybridizace mRNA	65
3.3.8	Zymografie matrixových metaloproteináz	66
3.3.9	Kvantitativní stanovení MMP-3.....	67
3.3.10	Kvantitativní stanovení MMP-9	68
3.3.11	Kvantitativní stanovení MMP-2.....	68
3.3.12	Elektrochemické stanovení metalothioneinu.....	69
3.3.13	Stanovení základních biochemických parametrů lipidového spektra	70
3.3.13.1.	Stanovení celkového cholesterolu	71
3.3.13.2.	Stanovení HDL-cholesterolu.....	71
3.3.13.3.	Stanovení LDL-cholesterolu	71
3.3.13.4.	Stanovení triacylglycerolů.....	71
3.4.	Statistické metody.....	73
4.	VÝSLEDKY	74
4.1.	Expozice laboratorního potkana 4denní hypoxii a 4denní hypoxii s hyperkapnií	74
4.1.1	Vliv 4denní hypoxie a hypoxie s hyperkapnií na tělesnou hmotnost a hmotnost srdce	74
4.1.2	Proteinová skladba pravé a levé komory srdce: koncentrace a obsah proteinů	76
4.1.3	Srdeční kolagen – koncentrace, rozpustnost a genová exprese.....	77
4.1.4	Aktivita srdečních MMP, genová exprese MMP-2 a TIMP-1	79

4.2.	Expozice laboratorního potkana 3týdenní hypoxii za současného podávání inhibitoru batimastat	81
4.2.1	Vliv 3týdenní hypoxie a hypoxie za současného podávání batimastatu na tělesnou hmotnost a hmotnost srdce	81
4.2.2	Proteinová remodelace srdečního svalu	82
4.2.3	Koncentrace srdečního kolagenu	84
4.2.4	Zymografie matrixových metaloproteináz na želatině	85
4.3.	Dlouhodobá aplikace metamfetaminu laboratornímu potkanovi	87
4.3.1	Vliv aplikace metamfetaminu na tělesnou hmotnost a hmotnost srdce	87
4.3.2	Vliv podávání metamfetaminu na kvantitativní a kvalitativní zastoupení kolagenních proteinů	88
4.3.3	Zymografie matrixových metaloproteináz na želatině	90
4.3.4	Stanovení metalothioneinu	90
4.4.	Soubor pacientů s poruchou lipidového metabolismu	92
4.4.1	Parametry lipidového spektra	92
4.4.2	Zymografická aktivita MMP v séru pacientů s DLP	94
4.4.3	Stanovení koncentrace MMP-3 a MMP-9 u zdravých jedinců a pacientů s DLP; vliv diety a farmakoterapie	95
4.5.	Soubor pacientů s traumatickým poškozením mozku	97
4.5.1	Koncentrace metalothioneinu u pacientů s poraněním mozku	97
4.5.2	Koncentrace matrixových metaloproteináz u pacientů s poraněním mozku	98
5.	DISKUSE	101
5.1.	Expozice laboratorního potkana 4denní hypoxii a 4denní hypoxii s hyperkapnií	101
5.2.	Expozice laboratorního potkana 3týdenní hypoxii – vliv batimastatu	105
5.3.	Dlouhodobá aplikace metamfetaminu	109
5.4.	Pacienti s poruchou lipidového metabolismu	113
5.5.	Soubor pacientů s traumatickým poškozením mozku	116
6.	ZÁVĚR	120
7.	SOUHRN	121
8.	SUMMARY	122
9.	LITERATURA	125

Příloha: SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem, za jejichž podpory tato práce vznikala.

Zvláště děkuji svému školiteli prof. MUDr. Richardu Průšovi, CSc. za odbornou a morální pomoc, bez které by tato práce nikdy nebyla dokončena.

Děkuji prof. RNDr. Václavu Pelouchovi, CSc. za námět a pomoc s experimentální částí této práce.

Většina experimentů, odběrů biologického materiálu a jeho analýz byla realizována na pracovištích Ústavu klinické biochemie a patobiochemie, Ústavu lékařské chemie a biochemie a Ústavu fyziologie UK 2.LF v Praze, Ústavu chemie a biochemie MZLJ v Brně a Ústavu farmakologie a toxikologie Univerzity Oulu, Finsko. Děkuji jejich zaměstnancům za vytvoření tvůrčího a svobodného prostředí.

Děkuji, že jsem potkal skvělé kolegy a přátele, s kterými bylo (a stále je) radost být a tvořit, Pavlínu Šantorovou, Janu Bíbovou, Davida Vajtra, Katku Zikmundovou a Reného Kizka.

Práce vznikla s podporou grantů:

GAUK 45/2001/C (*Remodelace extracelulární matrix v podmínkách hypoxie*)

GAUK 48/2003/C (*Účinky chronického užívání metamfetaminu na extracelulární matrix myokardu*)

IGA NR 8793-3/2006 (*Biochemická diagnostika expansní a pozdní dobarvující se kontuze u pacientů s poraněním hlavy*).

SEZNAM ZKRATEK

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ADAM	adamalysin
AdTS	adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika
AMK	aminokyselina
ANOVA	analýza rozptylu
AP-1	promotorový element AP-1
APMA	octan p-aminofenylrtuťnatý
ARE	antioxidant response element
B	batimastat
BW	tělesná hmotnost
CA	anhydráza kyseliny uhličitě
CMT	chemicky modifikovaný tetracyklin
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
DAI	difuzní-axonální poranění
DCM	dilatační kardiomyopatie
DLP	dyslipoproteinémie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP III	dipeptidylpeptidáza III
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
ECM	extracelulární matrix
EDTA	etylendiammintetraoctová kyselina
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
GCS	Glasgow Coma Scale
H	hypoxie, hypoxický
HBOT	hyperbarická kyslíková terapie
HC	hypoxie-hyperkapnie
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HMGCoA	3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzym A
HW	hmotnost srdce
HW/BW	relativní hmotnost srdce
K	kontroly, kontrolní skupina
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LV	levá komora srdeční

LV/BW	<i>relativní hmotnost komory srdeční</i>
MA	<i>metamfetamin</i>
MAP	<i>mitogenně aktivovaný protein</i>
MEROPS	<i>peptidázová databáze</i>
MHC	<i>hlavní lidský histokompatibilní komplex</i>
MMP	<i>matrixové metaloproteinázy</i>
MRE	<i>metal response element</i>
MT	<i>metalothionein</i>
MTF-1	<i>zinek responzivní transkripční faktor</i>
MT-MMP	<i>membránové matrixové metaloproteinázy</i>
NSE	<i>neuron specifická enoláza</i>
PDAB	<i>p-dimethylaminobenzaldehyd</i>
PDGF	<i>růstový faktor odvozený od krevních destiček</i>
PEA-3	<i>promotorový element PEA-3</i>
RNA	<i>ribonukleová kyselina</i>
ROS	<i>reaktivní kyslíkové částice</i>
RV	<i>pravá komora srdeční</i>
RV/BW	<i>relativní hmotnost pravé komory</i>
SDS	<i>dodecylsulfát sodný</i>
SDS-PAGE	<i>elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS</i>
SEM	<i>standardní chyba měření</i>
SPRE	<i>stromelyzin-1-PDGF responzivní element</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSC	<i>pufr chlorid sodný/citrát sodný</i>
TE pufr	<i>Tris-EDTA pufr</i>
TG	<i>triacylglyceroly</i>
TIMP	<i>tkáňový inhibitor matrixové metaloproteinázy</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>
Zip	<i>Zrt- a Irt-like proteiny</i>
ZnT	<i>protein pro transport zinku</i>

1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ZNALOSTÍ

1.1. VLASTNOSTI METALOPROTEINŮ A JEJICH KLASIFIKACE

1.1.1 ÚVOD

Důležité reakce v celé biosféře jako je např. produkce energie při fotosyntéze nebo oxidativní fosforylace jsou katalyzovány bílkovinnými látkami obsahujícími ve své struktuře jeden nebo více kovových prvků – **metaloproteiny**. Používání kovových prvků živými systémy je překvapující svým pozoruhodným funkčním rozsahem. Zahrnuje základní chemické reakce, jako je transport elektronů, přenos a aktivace kyslíku, hydrolýza, přenos a přeměna skupin, ale také procesy, při kterých vůbec nedochází k tvorbě nebo zániku vazby, jako je například tok draselných nebo sodných iontů napěťově řízenými kanály. Atomy kovů mohou tvořit relativně silné vazby s jejich ligandy a o to více příležitostí tak mají v molekulách proteinů, kde většina stavebních aminokyselin obsahuje potenciální donorové skupiny (imidazolové, karboxylové, karbonylové, hydroxylové, thiolové nebo thioesterové). Důležitým aspektem chemie kovů je to, že stejný kov se může účastnit řady rozličných reakcí v závislosti na prostředí, které jej obklopuje. Tím se myslí prostředí biomolekuly, která jej váže. Patrné je to například u železa v hemu, který může plnit funkci reverzibilního transportéru elektronů (např. v cytochromu), nosiče molekuly kyslíku (tak jak je to např. v hemoglobinu) nebo aktivátoru (cytochrom P 450). Ačkoliv je ve všech uvedených případech reakční kovové centrum identické, jeho reaktivita se odvíjí od charakteru zbytku molekuly. Chování kovového centra je výsledkem jemné souhry mezi termodynamickými vlastnostmi kovu, diktovanými jeho koordinační chemií, a stabilitou proteinových konformací. V extrémních případech je funkce kovu klíčová. Tak například u molekulových domén se zinečnatými prsty nedojde ke svinutí proteinu, pokud zde zinek chybí (Christianson, 1991). Metaloproteinu může však dominovat i protein. Tak je tomu v případě modře zbarvených center obsahujících měď v různých přenašečích elektronů a enzimech (Malmstrom, 1994).

1.1.2 STRUKTURA, VLASTNOSTI A FUNKCE METALOPROTEINŮ SPOJENÝCH SE ZINKEM

Proteiny spojené se zinkem je možno formálně rozdělit na 3 základní skupiny:

- 1) Zinek-enzymy
- 2) Zinek-neenzymové proteiny
- 3) Proteiny pro distribuci zinku

1.1.2.1. ZN-ENZYMY

Prvním objeveným enzymem obsahujícím zinek byla v roce 1940 anhydráza kyseliny uhličitě (carbonic anhydrase CA) (Keilin and Mann, 1940). V současnosti jsou známy již stovky enzymů obsahujících v molekule zinek. S rozvojem technik schopných detailní strukturní analýzy byla u většiny z těchto enzymů objasněna katalytická role zinku. Biologické vlastnosti Zn-enzymů se odvíjí od jejich výjimečné struktury. Až asi na dvě výjimky jsou molekuly Zn-enzymů tvořeny převládajícími beta strukturami, ty se podílejí na velmi stabilním svinutí molekuly, které vytváří nezvyklou architekturu molekuly v okolí místa pro vazbu kovového iontu a to i v případě jeho nepřítomnosti. Atakující skupiny aktivního místa enzymů katalyzujících větší substráty, tedy v našem případě zinkem vázaná voda a blízké organické postranní řetězce, musí projevovat jistou lokální pohyblivost. Teprve tehdy je zajištěna rychlá přeměna substrátů a uvolnění produktů a koordinace celého systému. Jak zinek tak přeměňované substráty jsou vázány pomocí postranních řetězců proteinové molekuly, ty jsou poněkud flexibilní, protože mají β -CH₂-sekce, které jsou naprosto odlišné od podobných struktur pro vazbu kovových iontů (např. v Fe₄S₄, cytochromech, vitamínu B₁₂ nebo enzymu F-430). Velké množství extracelulárních enzymů s podobnou funkcí má dva nebo více zinečnatých iontů v aktivním místě. Výhoda takovéto kombinace dvou nebo více atakujících kyselých skupin je více vysvětlena např. v knize *J.J.R Fraústo da Silva a R.J.P. Williams: The biological chemistry of the elements* (Fraústo da Silva and Williams, 2004). Velká většina těchto enzymů se účastní degradace a organizace extracelulární hmoty.

Je jenom několik cytoplazmatických enzymů, které se liší od předchozích. Pravděpodobně pouze ve dvou případech mají aktivní místa pouze kyslík-donorové ligandy a v jednom případě (fosfolipáza C) má aktivní místo N- a O-donorové ligandy. Tyto proteiny mají zcela helikální strukturu. Jeden nebo dva enzymy mají N/S ligandy a váží zinečnatý ion velmi pevně. U některých Zn-enzymů je sice zinek vázán na molekulu,

ale ne v aktivním místě. Zinek u těchto enzymů slouží jako příčná vazba (cross-link) mezi thiolovými skupinami, obvykle čtyřmi nebo kombinací thiolů a histidinů vytvářející celkem čtyři ligandy. Toto je takzvaně dvojité nebo svázaná příčná vazba a nachází se u cytoplazmatických proteinů jako je např. alkoholdehydrogenáza. Tato příčná vazba by mohla být částečně náhradou za –S-S- nebo vápenaté můstky extracelulárních proteinů, protože uvnitř buněk je většina –S-S- můstků nestabilní a podléhá redukci a vápenaté příčné vazby jsou nestabilní v cytoplasmě vzhledem k nízké koncentraci Ca.

Tabulka 1: Zinek-enzymy

Třída	Koordinace	Prostorová distribuce
Karboxypeptidázy (1)	HEH	vesikulární, extracelulární
Amino-peptidázy (1)	HEH	vesikulární, extracelulární
Alkalické fosfatázy (2)	DSDH	extracelulární+Mg ²⁺
Nukleázy (2)	WHDHHD	extracelulární
Kolagenázy (1)	HHX, [(C)nebo (H ₂ O)]	extracelulární
Fosfolipáza C (3)	HHE (H ₂ O) HWD (H ₂ O) HHDD	extracelulární (intracelulární ?)
β-laktamázy (2)	HHDDH	extracelulární
Glyoxalázy II (2)	HHDDH	extracelulární
Arylsulfatázy (2)	HHDDH	extracelulární
Fosfhydrolázy (2)	HHDD	extracelulární
Leucinamino-peptidáza (2)	KDDDE	cytoplazmatická
Kalcineurin (1)	DNHH (H ₂ O)	cytoplazmatická
Aspartáttranskarybamyháza (1)	CCCC	cytoplazmatická
RNA/DNA polymeráza (1)	CCHH	cytoplazmatická
Anhydráza kyseliny uhličité (1)	HHH (H ₂ O)	cytoplazmatická

H=histidin, C=cystein, D=aspartát, E=glutamát, S=serin, W=tryptofan, K=lysin, () = počet atomů zinku v aktivním místě enzymu (převzato z J.J.R. Fraústo da Silva a R.J.P. Williams, *The biological chemistry of the elements*, druhé vyd., Oxford University Press 2004)

Zinek u Zn-enzymů není uplatňován jen skrze hydrolytické procesy v hotovém enzymu, uplatňuje se i v různých stupních jeho syntézy v cytoplasmě. Typickým

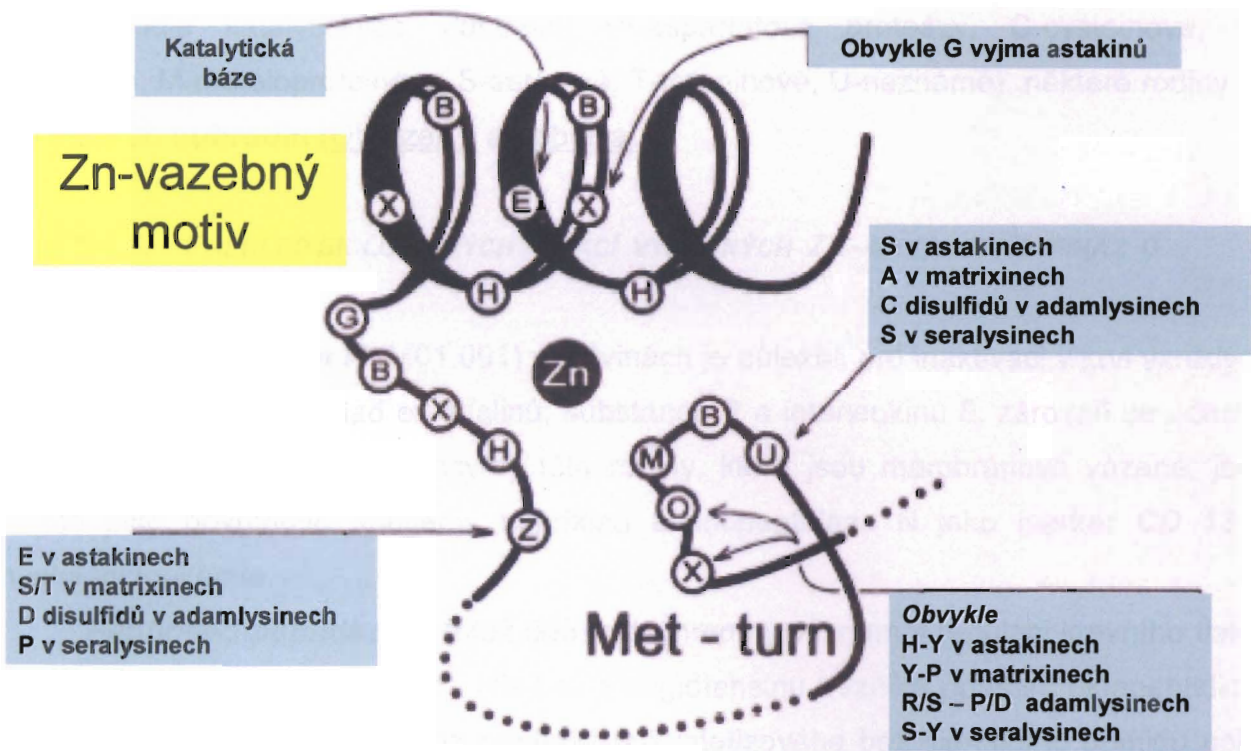
příkladem za všechny může být přítomnost zinku v molekule reverzní transkriptázy a RNA polymerázy. Jiným příkladem může být uplatnění zinku v syntéze rostlinných Zn enzymů, které zde plní podobnou funkci pro přenos metylových skupin jako u živočichů vitamín B₁₂ a v něm obsažený kobalt.

1.1.2.1.1. SKUPINA ZINEK DEPENDENTNÍCH METALOPROTEINÁZ

1.1.2.1.1.1. STRUKTURA A ROZDĚLENÍ ZINEK DEPENDENTNÍCH METALOPROTEINÁZ

Zinek dependentní metaloproteinázy (Zn-metaloproteinázy) je nejpočetnější skupina zinek-enzymů a je velmi rozšířená napříč všemi říšemi, mezi prokaryotními i eukaryotními organizmy. Zástupci této skupiny enzymů se účastní různých procesů jako je embryonální vývoj, formace kostí, botulinová nebo tetanová toxicita, reprodukce, artritida nebo nádorové procesy. Přibližně v posledních 20 letech počet objevů nových enzymů z této skupiny stoupl do takové míry, že pro jejich klasifikaci je vhodnější používat především kritérium jejich strukturní příbuznosti. Porovnáním aminokyselinové sekvence kolem ústředního strukturního motivu *HEXXH* došlo k rozlišení mezi pěti základními skupinami Zn-metaloproteináz a to termolysiny, astakiny, „serratia“ enzymy, matrixiny a prolysin metaloproteinázami (Jiang and Bond, 1992). Později byly do Zn-metaloproteináz začleněny další 4 skupiny enzymů, které mají rozšířené vazebné místo pro zinek *HEXXHXXGXXH*, v kterém třetí histidinový zbytek funguje jako třetí ligand zinku místo více vzdálené kyseliny glutamové v termolysinu. Pro tyto skupiny enzymů byl zaveden název **metzinkiny**. Obsahují tzv. **methioninový ohyb** (Met-turn) a díky němu mají i podobnou konformaci (Obrázek 1). Obdobně pro všechny enzymy shodující se v již zmiňovaném strukturním motivu *HEXXH* se ujal název **zinkiny** (Hooper, 1994). Pro přehlednost a zařazování proteináz byly vytvořeny různé klasifikační systémy, v této práci je použit systém *MEROPS* (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Velká Británie), který rozděluje proteinázy do systémů klanů a subklanů, rodin a subrodin na základě strukturních podobností (Rawlings et al., 2006) (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Tato databáze shromažďuje informace o zhruba 3000

známých proteolytických enzymech a jejich inhibitech. **Klan** je skupina



Obrázek 1: Methioninový ohyb. Velká písmena značí aminokyselinu v mezinárodním jednopísmenném kódu.

peptidáz, které vznikly evolučně z jednoduchého společného předchůdce. Každý klan v sobě zahrnuje jednu nebo více enzymových rodin, které vykazují svoji evoluční příbuznost, co se týče terciární struktury. Pokud není struktura známa, jsou do klanu zařazené dle podobnosti reziduí katalytického místa v polypeptidovém řetězci a ještě častěji dle obvyklého sekvenčního motivu kolem katalytických reziduí. Každý klan je identifikován dvěma písmeny, první uvádí katalytický typ rodin zahrnutých v klanu, druhý je samotné označení klanu. Některé rodiny nebyly ještě začleněny do klanů. Některé klany jsou rozděleny na **subklany**, protože je zřejmá jejich prastará odlišnost uvnitř klanu, např. MA(E) gluzinkiny a MA(M) metzinkiny. **Rodina** je soubor **homologních peptidáz**. Homologie se projevuje významnou podobností v aminokyselinové sekvenci každého typu peptidázy v rodině nebo jiného proteinu, který je nějakému typu peptidázy podobný. Podobnost musí existovat minimálně v peptidázové jednotce. Rodina může obsahovat

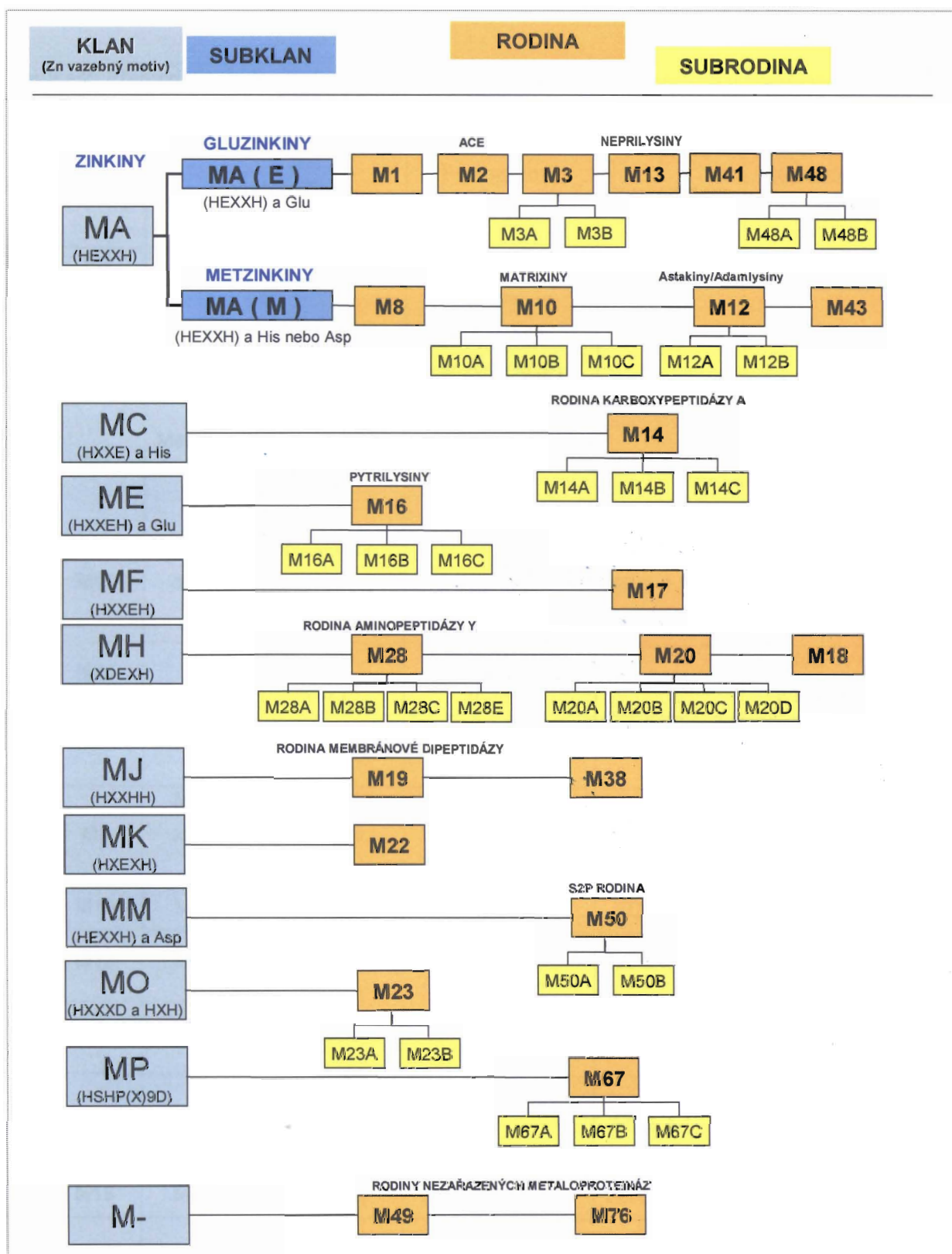
pouze jednu peptidázu, pokud žádný jiný homolog k ní ještě nebyl přiřazen. A naopak, samotný genový produkt jako je např. virový polyprotein může obsahovat více jak jednu peptidázu zařazenou do různých rodin. Každá rodina je označena písmenem a unikátním číslem podle katalytických vlastností (A-aspartátové proteázy, C-cysteinové, G-glutamové, M-metaloproteinázy, S-serinové, T-treoninové, U-neznámé), některé rodiny se dělí ještě do **subrodin** (Obrázek 2 a Tabulka 1).

1.1.2.1.1.2. PŘEHLED BIOLOGICKÝCH FUNKCÍ VYBRANÝCH ZN–METALOPROTEINÁZ U ČLOVĚKA

Aminopeptidáza N (M01.001) v ledvinách je důležitá pro inaktivaci v krvi vzniklých polypeptidáz jako například enkefalinů, substance P a interleukinu 8, zároveň se účastní proteolýzy v tenkém střevě. Enzymy této rodiny, které jsou membránově vázané, jsou známé jako povrchové antigeny, například aminopeptidáza N jako marker **CD 13** u myeloidní leukémie.

Peptidyl-dipeptidáza A (M02.005) má ohromný význam v regulaci krevního tlaku, štěpením C koncového dipeptidu His-Leu z angiotensinu I vzniká potentní oktapeptidický vasopresor angiotensin II. Většina peptidáz je syntetizována bez signálního peptidu nebo propeptidu a působí intracelulárně. Mitochondriální intermediární peptidáza je určitou výjimkou a obsahuje typický vedoucí mitochondriální peptid.

Jedna z funkcí peptidáz v rodině M3 je intracelulární degradace oligopeptidů. To zahrnuje štěpení signálního peptidu a tvorbu degradačních produktů. U obratlovců mohou být některé tyto peptidy navázány MHC třídou (York et al., 2003). Mnoho savčích biologicky aktivních peptidů je excelentními substráty pro působení oligopeptidáz jako je **thimet oligopeptidáza** nebo **neurolysin**.



Obrázek 2: Systém zinek dependentních metaloproteináz vyskytujících se u živočichů¹

¹ Ve schématu jsou uvedeny jen ty rodiny metaloproteináz, které obsahují ve své molekule zinek a zároveň jen ty, které se vyskytují u živočichů, ve většině případů tedy i u člověka. Bez tohoto omezení by bylo schéma daleko složitější, např. enzymová podpodtřída metaloproteináz má jinak 15 klanů a 53 rodin.

Tabulka 2: Přehled zinek dependentních metaloproteináz vyskytujících se u živočichů a člověka.
 Prototypový enzym má vždy v MEROPS nomenklatuře kód ve tvaru M(číslo rodiny).001

klan	rodina	Obsah rodiny	Prototypový enzym	EC nomenklatura	Alternativní název rodiny
MA	M1	Aminopeptidázy	Aminopeptidáza N	EC 3.4.11.2	
	M2	Metaloexopeptidázy	Angiotenzin-konvertující enzym (ACE)	EC 3.4.15.1	
	M3	Metalopeptidázy s různou aktivitou	Thimet oligopeptidáza (<i>Rattus norvegicus</i>)	EC 3.4.24.15	
	M13	Metaloendopeptidázy omezené na substráty menší než proteiny	Nepriylisin	EC 3.4.24.11	Nepriylisiny
	M41	ATP-dependentní metalopeptidázy	FtsH peptidáza (<i>E. coli</i>)	není	Rodina FtsH endopeptidázy
	M48	Metaloendopeptidázy	Ste 24 peptidázy (<i>S. cerevisiae</i>)	EC 3.4.24.84	Rodina Ste 24 endopeptidázy
	M8	Metaloendopeptidáza leishmanolysin a jeho homologa	Leishmanolysin (<i>Leishmania major</i>)	EC 3.4.24.36	Leishmanolysiny
	M10	Metaloendopeptidázy	Kolagenáza 1	EC 3.4.24.7	Matrixiny
	M12	Metaloendopeptidázy	Astakin (<i>Astacus astacus</i>)	EC 3.4.24.21	Astakiny a adamlysiny
	M43	Metaloendopeptidázy	Cytofagalysin (<i>Cytophaga sp.</i>)		Cytofagalysiny
MC	M14	Metalokarboxypeptidázy	Karboxypeptidáza A1	EC 3.4.17.1	Rodina karboxypeptidázy A
ME	M16	Metaloendopeptidázy	Pytrilysin (<i>E. coli</i>)	EC 3.4.24.55	Pytrilysiny
MF	M17	Aminopeptidázy	Leucylaminopeptidáza (<i>Bos taurus</i>)	EC 3.4.11.1	Rodina leucylaminopeptidázy

tabulka 2: pokračování

MH	M28	Aminopeptidázy a karboxypeptidázy	Aminopeptidáza S (<i>Streptomyces griseus</i>)		Rodina aminopeptidázy Y
	M20	Exopeptidázy, karboxypeptidázy, dipeptidázy a specializované aminopeptidázy	Glutamátkarboxypeptidáza (<i>Pseudomonas sp.</i>)	EC 3.4.17.11	
	M18	Metaloendopeptidázy	Aminopeptidáza I (<i>S.cerevisiae</i>)	EC 3.4.11.2	
MJ	M19	Dipeptidázy	Membránová dipeptidáza	EC 3.4.13.19	Membránové dipeptidázy
	M38	Omega peptidázy	Isoaspartyl dipeptidáza (<i>E.coli</i>)		Betaaspartyl dipeptidázy
MK	M22	Endopeptidázy, které štěpí jen O-sialoglykosylované proteiny	O-sialoglykoprotein-peptidáza (<i>Mannheimia haemolytica</i>)	EC 3.4.24.57	
MM	M50	Metaloendopeptidázy	S2P peptidáza	EC 3.4.24.85	S2P rodina
MO	M23	Endopeptidázy štěpící peptidoglykany stěny bakterií	β -lytická metalopeptidáza (<i>Achromobacter lyticus</i>)	EC 3.4.24.32	
MP	M67	Izopeptidázy uvolňující ubiquitin z ubiquitovaných proteinů	Poh 1 peptidáza (<i>S.cerevisiae</i>)		
M-	M49	Dipeptidylpeptidázy	Dipeptidylpeptidáza III (<i>Rattus norvegicus</i>)	EC 3.4.14.4	Rodina dipeptidylpeptidázy
	M76		Atp23 peptidáza		

Neprilysin (M13.001), metaloproteináza fungující v neutrálním prostředí, byl objeven v kartáčové stěně membrán Kennym a jeho kolegy (Kerr and Kenny, 1974).

Nepriylisin byl po dlouhou dobu jedinou známou metaloproteinázou z rodiny M13. Působí v okolí buněk, kde degraduje a přeměňuje polypeptidové substráty.

Fyziologické substráty enzymů z rodiny M41 jsou hlavně membránové proteiny. U člověka je především zajímavý mitochondriální proteinový homolog **paraplegin** (M41.006). Mutace genu pro paraplegin jsou spojené z autozomální formou hereditární spastické paraplegie (Atorino et al., 2003).

Leishmanolysin z rodiny M8 je nejvíce zastoupeným povrchovým proteinem promastigót Leishmanií a může velmi významně přispět k virulenci těchto parazitů (Yao et al., 2003). Tento enzym je zodpovědný za prostup parazita přes extracelulární matrix hostujícího organismu (McGwire et al., 2003).

Početná skupina **matrixinů** (M10) je hlavní skupinou enzymů degradujících extracelulární matrix a je jí věnována speciální kapitola této práce.

Metaloproteinázy z rodiny M8 jsou obvykle proteiny syntetizované se signálním peptidem jako propeptidy. Adamalysin **ADAM 17** je také znám jako TNF-alfa konvertující enzym, enzym zodpovědný za limitované proteolytické procesy. Endopeptidáza **ADAMTS13** (M12.241), také znám jako proteáza von Willebrand faktoru, působí jako normální ochrana před von Willebrandovou chorobou .

Enzymy z rodiny M14 jsou molekuly syntetizované bez signálních peptidů, ale jsou to zároveň propeptidy, které musí být přeměněny na aktivní enzymy. Zralé enzymy jsou obvykle rozpustné (např. **karboxypeptidáza A**, **karboxypeptidáza B**, **karboxypeptidáza U** (M14.009)), ale **karboxypeptidáza M** (M14.006) je membránově vázaná pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Funkce těchto enzymů je velmi rozličná. Zahrnuje trávení potravy (pankreatická karboxypeptidáza A a B) nebo přeměnu bioaktivních peptidů (**karboxypeptidáza E**, M14.005).

Medicínsky zajímavou metaloproteinázou ze skupiny M16 je **indulysin** (M16.002), který je fyziologicky významnou alfa-sekretázou, a který degraduje amyloidogenní beta-peptidy při Alzheimerově chorobě (Edland, 2004).

Savčí **leucylaminopeptidáza** z rodiny M17 je cytozolický enzym produkovaný ke štěpení peptidů, které vznikají činností intracelulárních proteináz. Je to jeden z enzymů, který je schopen stříhat peptidy produkované proteozómem pro antigenní třídu I a jeho gen je promotován interferonem gama (Beninga et al., 1998).

Glutamátkarboxypeptidáza II (M28.010) degraduje neuropeptidy Ac-Asp-Glu v mozku a zároveň přeměňuje folylpolygamaglutamát na pteorylglutamát ve střevě.

V rodině M28 se nachází mnoho neproteinázových analogů jako např. **receptor pro transferin** (M28.972)

Savčí **aspartylaminopeptidáza** z rodiny M18 je cytozolový enzym, který pravděpodobně přispívá ke katabolickým přeměnám peptidů. Mohl by přispívat k N-terminálnímu štěpení peptidů, které jsou určeny pro MHC třídu I.

Membránová dipeptidáza z rodiny M19 je lokalizovaná na povrchu buněk kartáčového lemu v ledvinách, plicích, střevech a v pankreatických sekrečních granulech, kde je upevněna pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Je syntetizovaná se signálním peptidem a C-koncovou hydrofobní doménou, která je odstraněna v posttranslačních procesech. Membránová dipeptidáza inaktivuje leukotrien D4 přeměnou na leukotrien E4; účastní se také degradace extracelulárního glutathionu, štěpí dipeptid Cys-Gly po glutamátu, který byl odstraněn γ -glutamyltranspeptidázou.

S2P peptidázy jsou zapojeny do regulace genové exprese proteolýzou transkripčních faktorů. S2P peptidáza v savčí membráně endoplazmatického retikula uvolňuje N-koncovou doménu transkripčního faktoru z membránově vázaných SREBP, uvolněná doména pak vstupuje do jádra a aktivuje geny pro kontrolu příjmu a syntézy cholesterolu (Zelenski et al., 1999).

Proteiny, které mají být degradovány proteozómem musí být nejdříve rozbaleny a ubiquitinové volné konce musí být odstraněny, to vše dělají komplexy PA700, 19S a komplex **COP9** z rodiny M67. **AMSH proteináza** ze stejné rodiny je spojena s endozómem a ovlivňuje stupeň přeměn ubiquitovaných proteinů určených k degradaci (McCullough et al., 2004, McCullough et al., 2006). **Poh1 peptidáza** je důležitá k zachování mitochondriální integrity, především prostřednictvím své C-koncové domény (Rinaldi et al., 2004).

Dipeptidylpeptidáza III (DPPIII, M49.001) z rodiny M49 je bohatě rozšířený cytozolický enzym, pravděpodobně určený pro vnitřní potřebu katabolizmu intracelulárních enzymů. Hodnoty DPPIII jsou zvýšeny v séru získaném z retroplacentální krve v porovnání s normálním sérem, což nasvědčuje tomu, že se může podílet na zvýšení hydrolýzy angiotenzinu pozorované během těhotenství (Shimamori et al., 1986).

1.1.2.2. NEENZYMOVÉ METALOPROTEINY OBSAHUJÍCÍ ZINEK

1.1.2.2.1. PROTEINY PRO DISTRIBUCI ZINKU

První gen pro savčí transportér zinku ZnT1 byl identifikován v roce 1995 (Palmiter and Findley, 1995). Před tím bylo nahlíženo na transport zinku v živočišných organizmech tak, že se děje prostřednictvím anionických komplexů jako jsou např. aminokyselinové (cystein nebo histidin) cheláty nebo prostřednictvím transferinových receptorů (Ripa and Ripa, 1995). V současnosti jsou známy dvě rodiny proteinů zodpovědných za transport zinku. **ZnT proteiny** snižují intracelulární zinek ovlivněním efluxu Zn z buněk nebo influxu do intracelulárního prostoru. **Zip² proteiny** usnadňují zinku transport z extracelulární tekutiny nebo z intracelulárních vesikulů do cytoplazmy (Palmiter and Huang, 2004).

Savčí ZnT rodina se skládá z 10 členů (ZnT1-10). Transportní aktivita zinku byla pro většinu z nich (ZnT1,2,4-8) potvrzena nezávisle přežitím buněk v médiu o vysoké koncentraci zinku přímo měřením absorpce/efluxu zinku nebo jeho akumulací v tranfektovaných nebo mutovaných savčích buňkách, kvasinkách nebo ovocytech (Palmiter and Huang, 2004, Cousins et al., 2006). Transportní mechanismus zprostředkovaný ZnT proteiny je neznámý. Buněčná extruze zinku a ukládání Zn v buněčných vesikulech probíhá proti koncentračnímu spádu a je tedy pravděpodobné, že ZnT proteiny fungují jako druhotné aktivní přenašeče nebo možná antiportery.

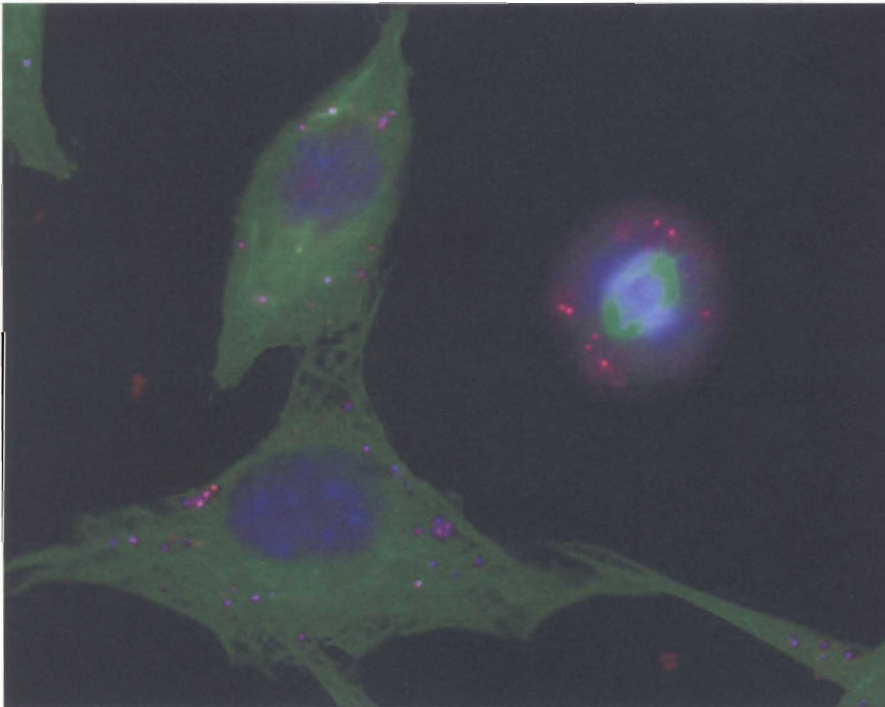
Existuje nápadná sekvenční homologie mezi lidskými ZnT proteiny (Devergnas et al., 2004, Chimienti et al., 2004). Sekvence se liší velikostí a většina z nich má 6 transmembránových domén s výjimkou ZnT5, který jich má 12. Tyto proteiny mají jak N tak C-terminální doménu na cytoplazmatické straně. Navíc většina ZnT proteinů má dlouhou intracelulární smyčku s proměnlivým počtem histidinových zbytků. Tyto smyčky by měly vázat zinek a tedy fungovat jako iontově-vazebné domény (Murgia et al., 1999).

Savčí Zip rodina proteinů se skládá ze 14 členů. Jejich schopnost přenášet Zn byla potvrzena pro Zip1-8 a 14 použitím transfekce DNA do savčích buněk (lidských embryonálních ledvinových, K562 a křeččích ovariálních). Transportní aktivita byla měřena absorbováním ⁶⁵Zn nebo použitím prób, které produkovaly emisi fluorescence. Mechanismus transportu Zn, který zprostředkovávají Zip proteiny není zcela pochopen. Absorbce zinku by mohla být řízena koncentračním gradientem. hZip1 a hZip2 přenašeče

² Zrt- a lrt-like proteins

totiž nepotřebují ATP (Gaither and Eide, 2001). Zip-dependentní transport je indukován anionty HCO_3^- a to poukazuje na mechanismus symportu (Gaither and Eide, 2000).

Zip rodina může být rozdělena do 4 subrodin: Zip I, Zip II, *gufA* a LZT (Cousins et al., 2006). Většina savších Zip proteinů včetně Zip4-8, Zip10 a Zip12-14 patří do LZT subrodiny. Zip1-3 jsou ze Zip II subrodiny; Zip9 ze Zip I subrodiny a Zip11 patří do *gufA* subrodiny. Většina Zip proteinů obsahuje 8 transmembránových domén, ale Zip6 jich má jenom 6. Transmembránové domény IV a I jsou vysoce konzervativní a mohou tvořit póry, skrz které procházejí kovové ionty (Gaither and Eide, 2001). Zip proteiny obsahují N a C-terminální doménu a dlouhou intracelulární smyčku s opakujícími se sekvencemi bohatými na histidin (Cousins et al., 2006). Na druhé straně imunohistochemické studie uzazují, že Zip14 má na histidin bohatou smyčku v extracelulárním prostoru (Liuzzi et al., 2005). Přítomnost specifických strukturních motivů může umožňovat Zip proteinům i jiné funkce než je pouze transport Zn. Například



Obrázek 3: Distribuce Zn-proteinů ve fibroblastu. Konfokální mikrofotografie myšičího fibroblastu značeného pro DNA (modrá), mikrotubuly (zelená). Nová generace zinkových práb je schopna se navázat na Zn^{2+} v buněčných váčcích (purpurová). Distribuce zinku se mění v buňce v průběhu dělení, jak je to vidět v pravém horním rohu.

metaloproteinázový motiv (HEXPHEXGD) v subrodině LZT proteinů dovoluje těmto proteinům fungovat jako matrixové metaloproteinázy nebo se účastnit katalytických procesů těchto enzymů (Cousins et al., 2006).

Většina ZnT proteinů byla nalezena v intracelulárních kompartmentech, obvykle spojených s endozómy, Golgiho komplexem nebo endoplazmatickým retikulem. ZnT1 je jediných transportérem umístěným v plazmatické membráně a je tak prvním regulátorem kontrolující buněčný Zn eflux (Ripa and Ripa, 1995). ZnT2 je lokalizován ve vesikulech pankreatických acinózních buněk. ZnT1 má také vesikulární lokalizaci, ale nachází se i v plazmatické membráně (Liuzzi et al., 2004). ZnT 9 se nachází v buněčném jádru během mitózy (Sim and Chow, 1999). Molekuly ZnT5 jsou lokalizovány v sekrečních váčcích pankreatických beta buněk a apikálních membránách enterocytů. ZnT10 by mohl být umístěný v plazmatické membráně, jak to ukazují některé softwarové výpočty. Většina Zip proteinů byla pozorována v plazmatické membráně, přesto se Zip 7 nachází i v Golgiho komplexu (Huang et al., 2005). Lokalizace Zip proteinů se může měnit během fyziologických podmínek a biologické dostupnosti zinku. Jakákoliv porucha regulace transportu zinku prostřednictvím jejich specifických transportérů je většinou spojena se specifickým onemocněním.

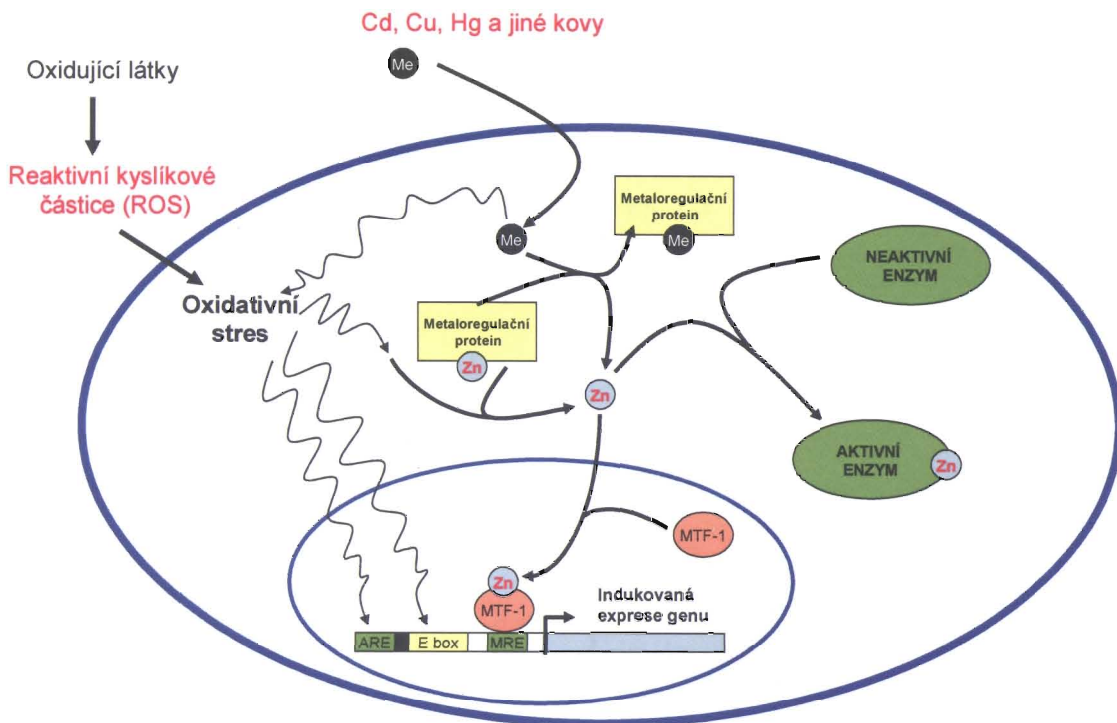
1.1.2.2.2. METALOTHIONEINY

V roce 1957 Margoshes a Vallee izolovali z ledviny koně nízkomolekulový protein, který vykazoval vysokou afinitu ke kadmiu a obsahoval vysoký počet thiolových skupin. Díky vysokému obsahu kovu a neobvyklé bioanorganické struktuře byl zařazen mezi metaloproteiny. Není příliš překvapující, že většina savčích tkání obsahuje na věku závislé bazální hladiny metalothioneinů (MT), které se účastní procesů závislých na regulovaném přívodu kovů, jako je buněčný růst nebo dělení. Zvýšené hladiny MT naopak nacházíme ve vyvíjejících se buňkách, jeho zvýšená exprese doprovází rakovinné bujení, je to perspektivní onkomarker (Kizek et al., 2004, Thirumoorthy et al., 2007).

Dnes je možno charakterizovat metalothioneiny jako **superrodinu neenzymatických polypeptidů** (61-68 aminokyselin) s malou molekulovou hmotností (6-7 kDa) a s unikátní aminokyselinovou sekvencí (unikátní rozmístění motivu Cys-X-Cys) a vysokým podílem síry a kovů. *In vivo* MT váží Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} nebo Hg^{2+} , zatímco *in vitro* jsou schopny navíc vázat Ag^+ , Bi^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} a Tc^{4+} . Nicméně hlavním vázaným kovem za fyziologických podmínek je zinek (Vasak, 2005). U savců se vyskytují

4 subrodiny MT (MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV), z toho nejdéle známé a nejlépe popsané jsou MT-I a MT-II. Lidské MT jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 izoform. Zatímco jeden MT-2A gen kóduje pouze jeden MT-2 protein, MT-1 existuje ve více izoformách. Konkrétně MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů na chromozómu 16q13 (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1I, MT-1J, MT-1K, MT-1L, MT-1X), což vede k rozdílnosti mezi izoformami MT-1 proteinu (Penkowa, 2006). Rozdíly v MT genech pravděpodobně hrají rozdílnou funkční roli v průběhu vývoje nebo při změnách fyziologických podmínek. V porovnání s lidskými geny, myší geny pro MT jsou méně komplexní, existuje vždy jeden gen pro jednu hlavní izoformu MT (jeden gen kóduje MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4) a ty jsou umístěny na chromozómu 8 (Penkowa, 2006).

Promotorové *cis*-elementy DNA (ve směru 5'→3') k úseku, který kóduje MT RNA, odpovídají na mnoho různých signálů a udržují nízké hladiny **bazální exprese MT mRNA** a syntézy proteinu. Jsou také indukovány ke zvýšené expresi MT v odpovědi na rozličné vývojové a environmentální signály (Haq et al., 2003). Ústředními promotory genů pro MT-1 a MT-2 jsou klasické TATA-boxy a iniciátorové oblasti (InR) k posílení transkripčního faktoru IID (TFIID), části preiniciačního komplexu, který upravuje bazální transkripci. Navíc obsahují sady promotorů odpovídající na kovy (**metal response element – MRE**), úseky s příbuznými nicméně odlišnými sekvencemi, např. gen pro MT-1 je u myši regulován šesti MRE (a-f). MRE jsou normálně potřebné pro indukci genu MT pomocí kovů, ale ukázalo se, že jsou stejně nepostradatelné i pro indukci MT při absenci kovů v prostředí (Samson and Gedamu, 1998). Pro bazální expresi je nejdůležitější MRE-c. MRE fungují ve spojení s dalším transkripčním faktorem, na zinku závislou molekulou tzv. zinek-responzivním transkripčním faktorem **MTF-1**, který se uplatňuje v procesu inducibilní exprese MT (Obrázek 4). Tento faktor je závislý na hladině zinečnatých iontů v organismu a prostřednictvím MRE reguluje jak bazální tak indukovanou expresi MT v organismu (Haq et al., 2003). U genů myši a křečka pro MT-1 se motiv E boxu (vazebné místo pro vnitřní pozdní transkripční faktor MLTF, někdy také označovaný jako **upstream stimulatory factor - USF**) se sekvencí **GGCCACGT-GACC** překrývá s tzv. **antioxidant response element - ARE** (se sekvencí TGACnnnGC) za tvorby kombinované sekvence MLTF/ARE, která je nezbytná jak pro bazální tak pro kadmiem

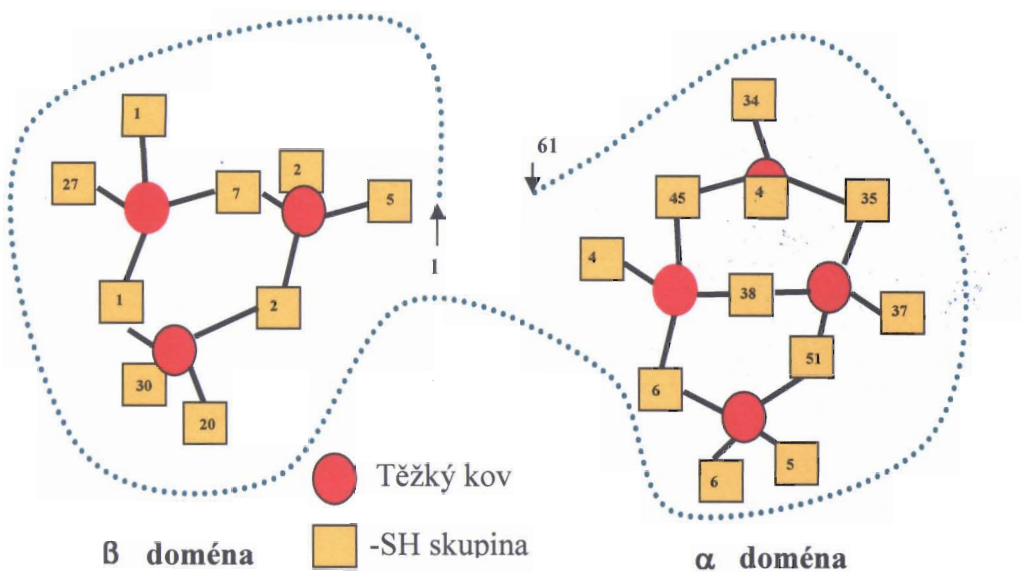


Obrázek 4: Schéma indukce genové exprese metalothioneinu. Na schématu je znázorněná buňka s cytoplazmatickou membránou a jádrem, které obsahuje na kov reagující gen. Metaloregulační protein ovlivňuje intracelulární dostupnost zinku. Metalothionein může za určitých okolností působit jako metaloregulační protein, který kontroluje dostupnost zinku pro enzymy a transkripční faktory. ARE = antioxidant response element, E box = cis-element DNA spojený s MLTF. Oxidativní stres ovlivňuje disociaci zinku z MT.

indukovanou expresi genu pro MT-1 (Datta and Jacob, 1997, Aniskovitch and Jacob, 1998). ARE se uplatňují v regulačních kaskádách spouštějící expresi genů pro tvorbu bílkovin, které brání organismus před poškozujícím útokem volných radikálů. Děje se tak přes interakci ARE s NF-E2 podobným faktorem 2 nebo Nrf-2 (Nguyen et al., 2003). Všechny promotorové geny MT obsahují alespoň jeden GC box (konzervativní sekvenční **GGGGCGGGG**), který odpovídá na působení transkripčních faktorů z rodiny Sp/XKLF *zinc finger transcription family* včetně faktoru Sp1. Toto působení přispívá k bazální transkripci MT (Philipsen and Suske, 1999). Bazální genová transkripce je kontrolována i pomocí **represorů**, o kterých existuje jen několik literárních údajů. Mezi ně např. patří zinc finger protein PZ120 nebo cykloheximid (Haq et al., 2003). Geny pro MT jsou

inducibilní i celou řadou anorganických agens (těžké kovy, reaktivní kyslíkové částice) nebo organickými signálními molekulami (citokiny, steroidní hormony).

V molekulách MT nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a 20 cysteinů se v primární sekvenci vyskytuje obvykle v těchto repetitivních: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X je označení pro jinou aminokyselinu než cystein. Molekula MT je tvořena dvěma vazebnými doménami (α, β), které jsou složeny z cysteinových klastrů. Sulfhydrylové zbytky cysteinu se podílejí na kovalentní vazbě s atomy kovů (Obrázek 5).



Obrázek 5: Předpokládaná struktura metalothioneinu koordinujícího 7 dvojmocných iontů kovů.

Tyto klastry vytvářené skupinami $-SH$ s kovem existují v obou globulárních doménách. Domény jsou k sobě vázány krátkým polypeptidovým úsekem bohatým na lysin. α -doména na svém C-konci obsahuje 11 cysteinů a je schopna vázat čtyři divalentní nebo 6 monovalentních kovů, zatímco N-koncová β -doména zahrnuje 9 cysteinů schopných vázat 3 divalentní nebo 6 monovalentních kovů (Miles et al., 2000). Cysteinové zbytky jsou tedy spojky, které mohou vázat 2 divalentní ionty, nebo jsou to koncové zbytky, které váží pouze jeden divalentní ion. Pokud se kovové ionty naváží na apothionein, polypeptidový řetězec se okamžitě svine do dvou nativních třírozměrných thiolových klastrů umístěných v každé z domén. Pouze v α -doméně je jediná krátká

oblast se sekundární strukturou (α -helix) a to tehdy, pokud je protein plně obsazený divalentními (nikoliv monovalentními) kovy (Vasak, 2005).

1.2. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A JEJICH ÚLOHA VE VYBRANÝCH PATOLOGICKÝCH PROCESECH A KLINICKÝCH STAVECH

1.2.1 ÚVOD

Matrixové metaloproteinázy (rodina M10), neboli **matrixiny** (MMP) jsou rodinou strukturně příbuzných enzymů patřící do početné skupiny zinek dependentních metaloproteináz. Jak již bylo uvedeno, MMP byly prokázány jak u obratlovců, tak u bezobratlých a dokonce i u rostlin. Vývojově však vznikly z daleko nižších organizmů, důkazem je například 59 % shodná aminokyselinová sekvence pro metaloproteinázový toxin-2 organismu *Bacteroides fragilis* s 27 aminokyselinovým řetězcem lidské intersticiální kolagenázy (MMP-1) (Borkakoti, 2000). Tyto enzymy se účastní většiny procesů, které degradují pojivovou tkáň, podílejí se na řadě dějů v průběhu ontogenetického vývoje (morfogeneze, angiogeneze, růst, procesy spojené s hojením ran) (Birkedal-Hansen, 1995, Shapiro, 1998, Zagris, 2001). Změněnou expresi a aktivitu MMP pozorujeme i ve většině zánětlivých, degenerativních a především maligních procesech, spojených se zvýšenou syntézou, degradací nebo porušenou maturací a organizací extracelulární matrix (ECM) (Arthur, 2000, Brinckerhoff et al., 2000, Obermuller et al., 2001, Stetler-Stevenson and Yu, 2001). Přehled fyziologických i patologických procesů při nichž MMP hrají klíčovou roli, je uveden v tabulce (Tabulka 3). Vedle MMP se na degradaci ECM podílejí i enzymy ze skupiny sulfhydrylových a serinových proteáz a jiné metalopeptidázy. V době vzniku této práce bylo známo 24 lidských matrixových metaloproteináz, pro jejich označení se používá zkratka MMP plus arabská číslice. Přehled známých MMP včetně jejich značení je uveden v tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 3: Matrixové metaloproteinázy ve fyziologických a patologických procesech

Fyziologické procesy	Patologické procesy	
Angiogeneze	Artritida	Metastáze
Apoptóza	Alzheimerova choroba	Nefritidy
Cervikální dilatace	Ateroskleróza	Neurologické choroby
Cyklus vlasového váčku	Cévní onemocnění	Onemocnění periodontu
Děložní cyklus	Emfyzém	Osteoartritida
Embryonální vývoj	Fibrotické plicní choroby	Porušení hematoencefalické bariéry
Implantace blastocysty	Gastrický vřed	Rakovina
Imunitní odpověď	Guillianova-Barreova choroba	Revmatoidní artritida
Kostní remodelace	Choroby CNS	Roztroušená skleróza
Nervový růst	Jaterní cirhóza	Sorsbyova dystrofie očního pozadí
Orgánová morfogeneze	Jaterní fibróza	
Ovulace	Kardiovaskulární choroby	
Poporodní uterinní involuce	Korneální ulcerace	
Zánět	Kožní ulcerace	

Tabulka 4: Přehled MMP

Klasifikace matrixových metaloproteináz				
MMP	Alternativní název	EC číslo	Chromozóm	Substráty
MMP-1	Kolagenáza (typ I, intersticiální)	EC3.4.24.7	11q22-q23	Kolageny (I,II,III,VIII a X); želatina; agrekan; L-selektin; IL-1 β proteoglykany; entaktin; ovostatin; MMP-2; MMP-9
MMP-2	Želatináza A 72 kDa Želatináza typ IV kolagenáza	EC3.4.24.24	16q13	Kolageny (I,IV,V,VII,X,XI a XIV); želatina; elastin; fibronektin; agrekan; MBP; osteonektin; laminin-1; MMP-1; MMP-9; MMP-13
MMP-3	Stromelysin-1 Proteoglykanáza	EC3.4.24.17	11q23	Kolageny (III,IV,V, a IX); želatina; agrekan; perlekan; dekorin; laminin; elastin; kasein; osteonektin; ovostatin; antaktin; plasminogen; MBP; IL-1 β ; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13
MMP-7	Matrilysin Putativní MMP	EC3.4.24.23	11q21-q22	Kolageny (IV a X); želatina; agrekan; dekorin; fibronektin; laminin; entaktin; elastin; kasein; transferin; plasminogen; MBP; β 4-integrin; MMP-1; MMP-2; MMP-9; MMP-9/TIMP-1
MMP-8	Neutrofilová kolagenáza	EC3.4.24.34	11q21-q22	Kolageny (I,II,III,V,VII,VIII a X); želatina; agrekan; fibronektin
MMP-9	Želatináza B	EC3.4.24.35	20q11.2-q13.1	Kolageny (IV,V,VII,X a XIV); želatina; entaktin; agrekan; elastin; fibronektin; osteonektin; plasminogen; MBP; IL-1 β
MMP-10	Stromelysin-2	EC3.4.2.22	11q22.3-q23	Kolageny (III-V); želatina; kasein; agrekan; elastin; MMP-1; MMP-8
MMP-11	Stromelysin-3	nepřirazeno	22q11.2	Neznámý (kasein)
MMP-12	Makrofágová metaloelastáza	EC3.4.24.65	11q22.2-q22.3	Kolagen IV; želatina; elastin; kasein; fibronektin; vitronektin; laminin; entaktin; MBP; fibrinogen; fibrin; plasminogen
MMP-13	Kolagenáza-3	nepřirazeno	11q22.3	Kolageny (I,II,III,IV,IX,X a XIV); želatina; plasminogen; agrekan; perlekan; fibronektin; osteonektin; MMP-9
MMP-14	MT1-MMP	nepřirazeno	14q11-q12	Kolageny (I-III); želatina; kasein; fibronektin; laminin; vitronektin; entaktin; proteoglykany; MMP-2; MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	nepřirazeno	16q12.2-q21	Fibronektin; entaktin; laminin; perlekan; MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	nepřirazeno	8q21	Kolagen III; želatina; kasein; fibronektin; MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	nepřirazeno	12q24	Neznámý
MMP-18	Kolagenáza-4	nepřirazeno	neznámý	Kolageny (I,II,III,VIII a X); želatina; agrekan
MMP-19	RASI-1	nepřirazeno	12q14	Želatina; agrekan; fibronektin
MMP-20	Enamelysin	nepřirazeno	neznámý	Amelogreinin; agrekan
MMP-21		nepřirazeno	1p36.3	Neznámý
MMP-22		nepřirazeno	1p36.3	Neznámý
MMP-23		nepřirazeno	neznámý	Neznámý
MMP-24	MT5-MMP	nepřirazeno	20q11.2	Neznámý
MMP-25	Leukolysin/MT6-MMP	nepřirazeno	16p13.3	Pro-želatináza A; fibrin; fibronektin; kolagen IV; želatina
MMP-26	Endometáza, matrilysin-2	nepřirazeno	neznámý	Želatina α ; I β 1; fibrinogen; fibronektin; vitronektin
MMP-28	Epilysin	nepřirazeno	17q11.2	Kasein

1.2.2 STRUKTURA MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ

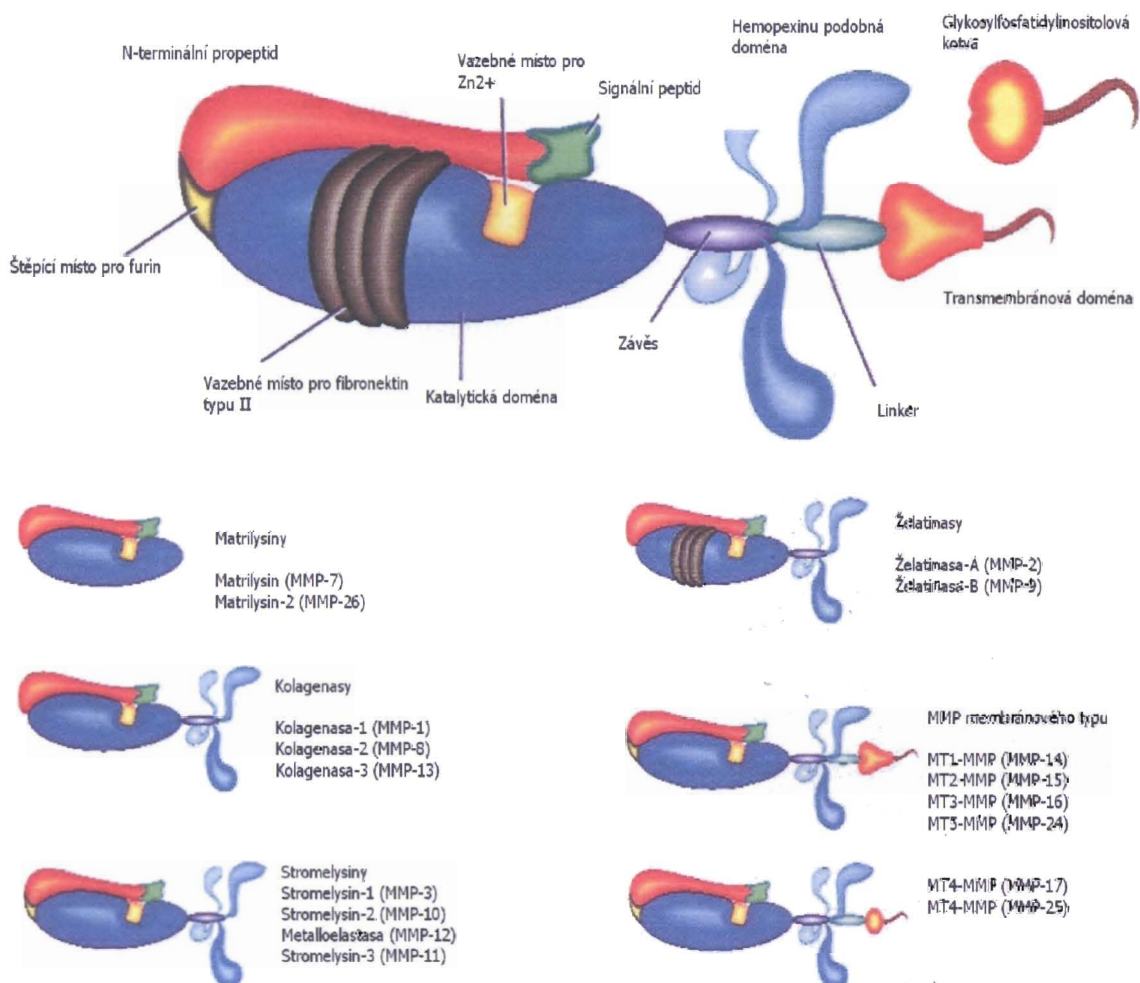
Jsou to homologní proteiny, které je možno podle společných rysů rozdělit do 6 skupin: kolagenázy, stromelysiny, matrilysiny, želatinázy, membránové metaloproteinázy a jiné MMP. Klasifikace není zcela jednotná a v literatuře se můžeme setkat i s jiným dělením (Kukacka et al., 2005). Všechny jsou to zinek a vápník dependentní endopeptidázy. Jsou syntetizovány ve formě **preproenzymů** (signální peptid obsahuje cca 20 aminokyselinových zbytků), z buňky jsou pak většinou sekretovány jako neaktivní **proenzymy** (vyjma membránových MMP). Molekula proenzymu je organizována do 3 základních strukturních domén: tj. N-terminálního propeptidu, katalytické domény a C-terminální části molekuly (Obrázek 6) (Borkakoti, 2000).

N-terminální propeptid obsahuje přibližně 80-90 aminokyselin, mimo jiné cystein, jehož postranní řetězce interagují s katalytickým zinkovým atomem přes thiolovou skupinu (tzv. cysteinové sepnutí) a zajišťují tak enzymovou latenci proenzymu. V propeptidu je přítomná vysoce konzervativní sekvence (...PRCGXPD...), jejím odstraněním dojde k aktivaci zymogenu (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990).

Katalytická doména (cca 170 aminokyselin) obsahuje zinek-vazebný motiv HEXXHXXGXXH a upevněný methionin, který vytváří unikátní strukturu, již zmíněný methioninový ohyb (Obrázek 1). Mimochodem právě tato struktura je charakteristická i pro ostatní metzinkiny, mezi které MMP náleží. Doména se skládá z pětiramenného β -listu, tří α -helixů a spojovacích smyček. Katalytická doména obsahuje dva zinečnaté kationty a 2-3 vápenaté kationty. Jeden Zn^{2+} je přítomen přímo v aktivním místě a účastní se přímo katalytických procesů, druhý Zn^{2+} (také nazývaný strukturní) a současně i Ca^{2+} jsou vzdáleny od Zn^{2+} v katalytickém místě přibližně 12 Å (Dhanaraj et al., 1996).

C-terminální doména vykazuje strukturní podobu s proteiny tzv. hemopexinové rodiny, kam patří např. hemopexin, vitronektin či placentální protein II (má něco kolem 210 aminokyselinových zbytků). Vyznačuje se elipsoidním diskovitým prostorovým tvarem se 4 listovými β -strukturami připomínající vrtuli, každý list se skládá ze 4 antiparalelních β -pramenů a α -helixu. První a čtvrtý list jsou spojeny disulfidickým můstkem (Gomis-Ruth et al., 1996). Katalytická a C-terminální doména, jak to bylo např. ukázáno u kolagenázy-1 (Gomis-Ruth et al., 1996), jsou zabaleny jako entity v krystalu se spojícím flexibilním **peptidovým linkerem** neboli závěsem („hinge-doména“), který je volně připojen. Tento závěs má extrémně variabilní délku, u kolagenáz obsahuje jen 16 zbytků, MMP-1,5 má

naopak 65 zbytků. Přesná funkce linkeru (obsahuje hodně prolinu), který spojuje katalytickou a hemopexinovou doménu není zcela objasněna.



Obrázek 6: Struktura prototypové MMP a jednotlivé skupiny matricových metaloproteináz.

Hemopexinová doména (Obrázek 6:) je nezbytná pro kolagenázy, které štěpí trojšroubovici intersticiálního kolagenu, katalytická doména u nich vykazuje proteolytickou aktivitu k jiným substrátům (Bode, 1995). Matrilysiny tuto doménu naopak nemají.

U skupiny transmembránových matricových metaloproteináz (MT-MMP) se nachází totiž navíc **transmembránová doména**, která váže enzym k povrchu buňky. Tuto doménu

tvorí hydrofobní řetězec s cca 25 aminokyselinami s rozpoznávacím motivem RXKR pro purinu podobné konvertázy na konci propeptidového řetězce (výjimkou je MT4-MMP a MT6-MMP). MT4-MMP a MT6-MMP jsou připevněny k buněčnému povrchu pomocí glykosylfosfatidilinozitolové (GPI) membránové kotvy (Buttner et al., 1998, Nagase and Woessner, 1999, Borkakoti, 2000, Ye, 2000). Želatinázy obsahují doménu vykazující strukturální podobnost s matrixovými proteiny, 3 tandemy kopií domény (58 AMK) se sekvencí podobné pro fibronektin typu II vazebné doméně kolagenu je nalézána u všech želatináz, zatímco doména s podobností pro typ kolagenu V jen u delších želatináz (Murphy et al., 1994).

Naproti tomu matrilysinům (MMP-7 a MMP-26) chybí hemopexinu podobná doména. Jsou to jedny z nejmenších molekul MMP. MMP-23 navíc obsahuje hydrofobní N-terminální signální kotvu (Uria and Lopez-Otin, 2000, Wilson and Spinale, 2001). MMP-19, MMP 20 a MMP-27 a MMP-12 je možno řadit mezi první členy nové skupiny MMP. Tato skupina má sice doménové struktury: signální sekvenci, latentní doménu, katalytickou doménu a C-terminální peptid podobný hemopexinu, ale chybí jim nějaký výrazný strukturální znak, který by je přiřadil k již existujícím skupinám (Stracke et al., 2000, Lohi et al., 2001). Některé další MMP, např. MT-MMP a stromelysin-3, obsahují ve své molekule rozpoznávací motiv pro proteinovou konvertázu RXRXKR, (Marchenko et al., 2001).

1.2.3 MECHANIZMUS ÚČINKU A SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA MMP

Většina MMP je schopna degradovat majoritní i minoritní složky extracelulární hmoty. Řada MMP má proto skutečně širokou substrátovou specifitu. Pozoruhodnou výjimkou jsou MMP-11 a MMP-23, jejichž schopnost štěpit komponenty ECM je velmi nízká. To však nevylučuje, že nedovedou štěpit jiné molekuly (MMP-11 např. štěpí serpin) (Pei et al., 1994, Ohnishi et al., 2001). MMP se však zapojují i do procesů spojených se štěpením nebo aktivací molekul, které tvoří ECM (např. MMP-2,-3,-7 štěpí dekorin, který je důležitým rezervoárem TGF- β_1). Štěpením dekorinu se do tkáně uvolňuje růstový faktor a iniciuje další procesy, které nemusejí přímo souviset s extracelulární hmotou (Imai et al., 1997).

1.2.3.1. KOLAGENÁZY

Při neutrálním pH štěpí kolagenázy nativní šroubovici kolagenu bez předchozí denaturace molekuly. Tím se liší od ostatních MMP. Patří sem MMP-1, -8, -13. Rozštěpí α řetězec intersticiálního kolagenu (typu I,II,III) na 2 specifické části, $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ fragment, v místě molekuly, která má uvolněnou trojšroubovici (chybí zde hydroxyproliny a je zde více hydrofobních skupin): u α_1 řetězce kolagenu typu I je to sekvence Gly⁷⁷⁵/Ile⁷⁷⁶, u α_2 řetězce kolagenu typu I je to Gly⁷⁷⁵/Leu⁷⁷⁶ (Netzel-Arnett et al., 1991, Prockop and Kivirikko, 1995). Enzymy z této skupiny se podstatně liší svou substrátovou specifitou, např. neutrofilová kolagenáza (MMP-8) upřednostňuje typ I, zatímco intersticiální kolagenáza (MMP-1) kolagen typu III. MMP-3 sice váže kolagen typu I, ale jeho trojšroubovici neštěpí (Allan et al., 1991, Murphy et al., 1992, Aimes and Quigley, 1995). MMP-13 štěpí kolagen typu I a III, ale pomaleji než typ II (Knauper et al., 1996).

Kolagenázy vykazují 2 odlišné aktivity – *katalytickou a substrát vazebnou*. De Souza aj. (De Souza et al., 1996) se domnívají, že na prolin bohatá „hinge-doména“ intersticiální kolagenázy vytváří kolagenu podobnou konformaci. S touto doménou je enzym schopen rozrušit kvartérní strukturu kolagenové trojšroubovice. Obě podobné struktury kolagenu i kolagenázy spolu interagují za tvorby tzv. prolinového zipu (proline zipper). Tento destabilizující krok určuje další štěpení. Katalytická doména (po této destabilizaci struktury) štěpí jen jedno vlákno kolagenové trojšroubovice v rozvolněné struktuře. Po tomto rozštěpení se dalšího štěpení mohou účastnit i jiné MMP. Určitý význam zde má i hemopexinu podobná doména. Stabilizuje nepřímo prokolagenu podobnou doménu kolagenázy. Jinou možností je, že tato doména zajišťuje nefunkční vazbu substrátu a teprve „hinge-doména“ zajistí správné nasměrování substrátu před jeho štěpením (Murphy and Knauper, 1997, Chung et al., 2000). **Membránově vázané MMP (MT-MMP)** vykazují zhruba stejnou substrátovou specifitu jako analogické volné MMP. Štěpí především kolagen, jsou však schopny štěpit i jiné substráty. Liší se i v aktivitě (např. MMP-14 je 5-7krát méně účinnější při štěpení hydrolyzovaného kolagenu typu I než analogická MMP-1, ale naopak vykazuje 8krát vyšší želatinolytickou aktivitu než MMP-1 (Ohuchi et al., 1997)). MT4-MMP štěpí želatinu a syntetické substráty, ale ke kolagenu typu I a IV, fibronektinu či lamininu je intaktní (Wang et al., 1999). Jiné jsou schopny štěpit proMMP a tím je aktivovat (podrobněji viz aktivace a inhibice MMP).

1.2.3.2. ŽELATINÁZY

Do této kategorie patří MMP-2 a MMP-9. Želatinázy štěpí především denaturovaný kolagen a intaktní kolagen typu IV v bazálních membránách. Jsou však schopné štěpit i nedenaturované kolageny typu V, VII, X, XIV, fibronektin, agrekan a elastin. V případě MMP-2 se dokonce uvažovalo, že je schopna štěpit nativní kolagen typu I (Aimes and Quigley, 1995), další studie však ukázaly, že se pouze váže na intaktní kolagen, aby bylo zabráněno její autolytické inaktivaci (Ellerbroek et al., 2001). MMP-9 kromě želatiny a jiných forem denaturovaného kolagenu štěpí celou řadu jiných fyziologických substrátů (Senior et al., 1991, Gijbels et al., 1993, Franchini et al., 1998, Belaaouaj et al., 2000, Liu et al., 2000b). Přestože stále nejsou plně poznány štěpené sekvence, hlavní, která byla štěpena většinou MMP (nejen MMP-9), obsahovala motiv Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr), kde X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek a Hy je hydrofóbní aminokyselinový zbytek v pozici P₃ až P₂. Jiná skupina obsahovala motiv Gly-Leu-(Lys/Arg) v pozici mezi P₁ a P₂. Poslední skupina substrátů obsahovala argininové zbytky jak v P₁ tak v P₂; tyto substráty jednoznačně preferovala MMP-9 (Kridel et al., 2001).

1.2.3.3. STROMELYSINY

Stromelysiny mají relativně širokou substrátovou specifitu, štěpí především nekolagenní proteiny ECM (proteoglykany, glykoproteiny, fibronektin a laminin). Kolagen typu IV je štěpen stromelysinem v globulární nikoliv však v helikální konformaci.

1.2.3.4. MAKROFÁGOVÁ ELASTÁZA A OSTATNÍ MMP

Do této kategorie patří MMP, které štěpí i jiné molekuly. Makrofágová elastáza (MMP-12) se o svoji schopnost štěpit elastin dělí jen s několika málo MMP (želatinázy a matrilysin). Dovede však štěpit i fibronektin, laminin, kolagen bazálních membrán, entaktin, chondroitinsulfát a jiné (Gronski et al., 1997). To umožňuje makrofágům penetrovat bazální membrány a tak následně remodelovat zánětem postiženou tkáň. Bazální membrány však degraduje i MMP-19 (Stracke et al., 2000). Složky skloviny, především majoritní emalogenin, specificky degraduje MMP-20 (Stracke et al., 2000). Mnohé MMP (MMP-3, MMP-13 a MMP-8, MT1-MMP) štěpí *in vitro* vazbu agrekanu IGD³ v pozici Asn³⁴¹-Phe³⁴² (Buttner et al., 1998).

³ IGD=úsek lidského agrekanu obsahující globulární doménu G1 a G2

1.2.4 AKTIVACE A INHIBICE MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ

Regulace aktivity MMP je komplexní proces. Zahrnuje různé úrovně aktivace latentních MMP, inhibici, sekreci molekuly enzymu až po regulaci transkripce genu či inhibici aktivity MMP tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMP). Selektivní exprese genů pro tkáňově specifické MMP a jejich inducibilita biologicky aktivními molekulami (růstové faktory, cytokiny, onkogeny, tumorové promotery) je v současné době studována na řadě pracovišť.

1.2.4.1. REGULACE MMP NA ÚROVNI GENOVÉ EXPRESE

Většina genů pro MMP je inducibilní. Kromě biologicky aktivních molekul je možno geny indukovat i různými chemickými látkami, např. estery formolu (Auble and Brinckerhoff, 1991). Expresi genů je možno potlačit některými supresivními faktory (TGF- β , glukokortikoidy, kyselina retinová) (Wada et al., 1998, Duivenvoorden et al., 1999). Geny pro MMP jsou exprimovány jen tehdy, pokud je tkáň, ať už za fyziologických nebo patologických podmínek, remodelována. Výjimkou je exprese MMP-2. Regulace se uskutečňuje na úrovni aktivace a inhibice enzymové aktivity (Nagase et al., 1992). Promotory pro většinu MMP genů zahrnují shodný AP-1 element v pozici -70 a jednu nebo dvě kopie PEA-3 elementu v pozici mezi -140 a -200. První reaguje s Fos a Jun protoonkogenovou rodinou, element PEA-3 s Ets rodinou transkripčních faktorů. Mutační analýzy ukázaly, že AP-1 úsek samotný nebo v kombinaci s PEA-3 reguluje základní stupně a inducibilitu těchto genů pomocí různých molekul. Transkripční faktory, které rozpoznávají tato místa, jsou již zmíněné protoonkogeny v konformaci *cis* (*cis*-elementy). Např. stromelysin-1-PDGF responzivní element (SPRE), jeden z těchto transkripčních faktorů, rozpoznává místo -1573 na genu pro MMP-3, ale byl identifikován i na jiných promotorech genů MMP, zřejmě se proto obecně uplatňuje v regulaci exprese MMP genů (Ye, 2000). Přirozené sekvenční variace promotorů MMP genů mohou různě modifikovat expresi genů MMP u různých organismů. Kromě promotorů je možno geny indukovat přes různé signální dráhy. Zánětlivé cytokiny nepřímo ovlivňují expresi genů pro MMP, TNF- α a IL-1 spouští ceramidovou signální dráhu. Ceramid dependentní exprese MMP-1 v lidském kožním fibroblastu je ovlivňována třemi odlišnými MAP kinázovými dráhami: ERK1/2, stresem aktivovanou proteinovou kinázou (SAPK)/JNK a p38 (Spiegel et al., 1996, Korzus et al., 1997, Reunanen et al., 1998). Inducibilním faktorem je i ultrafialové záření B, které zvyšuje expresi MMP-1, MMP-3 a MMP-9 u lidských dermálních

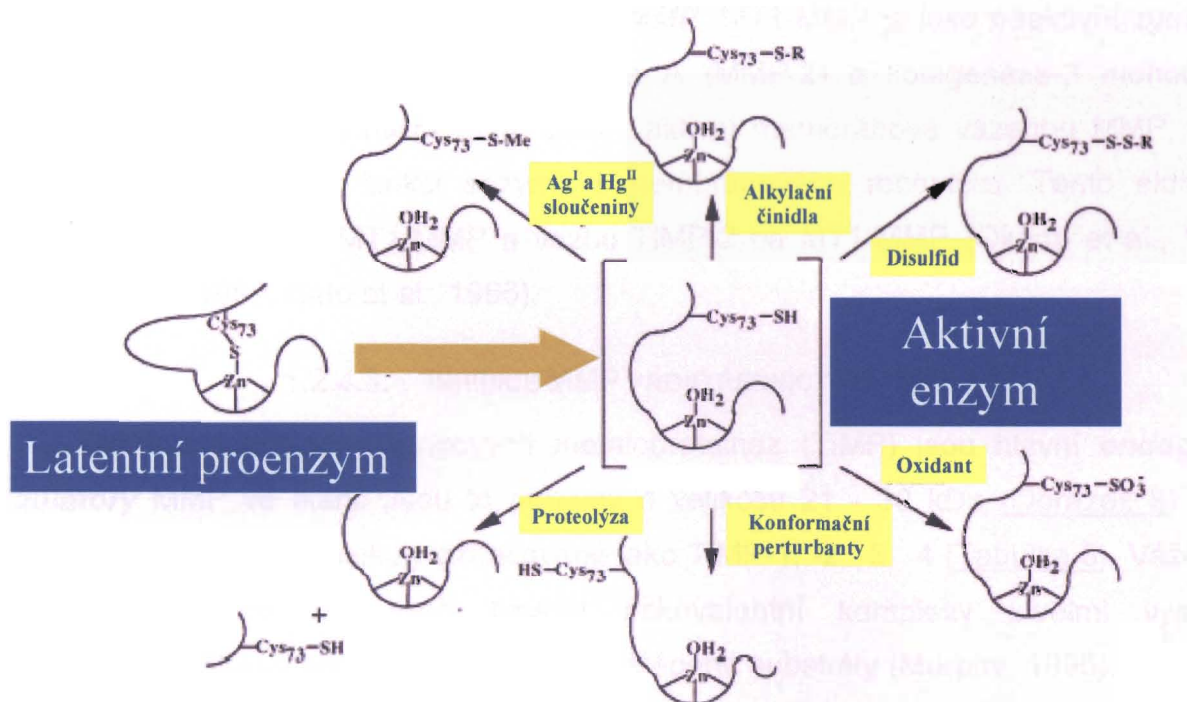
fibroblastů, stresem se aktivují proteinové kinázy JNK-2 přes reaktivní volné radikály a přes peroxidaci lipidů (Fisher et al., 1996, Brenneisen et al., 1998). Expresi genů ovlivňuje také interakce typů ECM–buňka a buňka–buňka. Příkladem může být glykoprotein EMMPRIN⁴, který byl poprvé identifikován na povrchu lidských tumorových buněk, stimuluje lidské fibroblasty k produkci MMP-1, -2 a -3 a zvyšuje expresi mRNA MMP-1; tento stimulační efekt vyžaduje aktivitu p38 (Biswas et al., 1995) (Lim et al., 1998). Syntézu MMP či EMMPRIN je možno ovlivnit i změněnou hemodynamickou zátěží (Li et al., 2000a). Exprese MMP-9 je indukována interakcí $\alpha_5\beta_1$ integrin-fibronektin během diferenciací mikrofágů (Xie et al., 1998). Exprese MT1-MMP je vyvolána buňkami endotelu, fibroblasty i neoplastickými buňkami přes interakci $\alpha_2\beta_1$ integrinem (Seltzer et al., 1994).

1.2.4.2. REGULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY MMP MECHANIZMEM CYSTEINOVÉHO SEPnutí

MMP jsou vylučovány z buňky jako zymogeny. V extracelulárním prostoru je určitá zásoba neaktivních MMP, vázaných na různé složky ECM; v případě potřeby mohou být rychle aktivovány. MMP-2 se váže na struktury ECM obsahující elastin, MMP-3 na bazální membrány a příležitostně na kolagenní fibrily a MMP-13 na proteoglykany, kolagen a elastin (Lijnen et al., 1999). Forma „skladování“ v latentní formě není univerzálně stejná pro všechny MMP. Např. MMP-8 je skladována ve specifických granulích, zatímco MMP-1 a MMP-3 jsou konstitutivně produkovány činností cytokinů a zánětlivých mediátorů (Borkakoti, 2000).

Po odštěpení propeptidu se ze zymogenů MMP stávají **aktivní enzymy**. Propeptid obsahuje velmi konzervativní sekvenci PRCG[V/N]PD, která udržuje enzym v latentní formě tím, že cysteinový zbytek tohoto propeptidu svírá zinečnatý kation v katalytickém místě enzymu. Motiv PRCG[V/N]PD je obvykle nalézán v propeptidech matrixinů, ale –SH skupina této sekvence se vyskytuje jen v nativních propeptidech. ProMMP nereagují snadno s –SH reaktanty dokud Zn^{2+} v proMMP není odstraněn nějakou chelatační molekulou (Springman et al., 1990, Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). SH cysteinová skupina

⁴ extracellular matrix metalloproteinase inducer



Obrázek 7: Regulace enzymové aktivity MMP¹ mechanismm cysteinového sepnutí. Látky a děje, které způsobují aktivaci katalytického zinku

v PRCG[V/N]PD interaguje se Zn^{2+} v enzymatickém aktivním místě. Tato interakce $[Zn^{2+}$ -cystein] udržuje zymogen inaktivní. Aktivace enzymu je vysvětlována tzv. mechanismem cysteinového sepnutí (cystein switch) (Nagase and Woessner, 1999). Klíčovým krokem je disociace interakce zinek-cystein. Zinek pak interaguje s vodou. Extracelulární aktivace enzymu zahrnuje 2 kroky. První je iniciační štěpení propeptidu MMP proteázou, destabilizace propeptidových vazebných interakcí a přerušení koordinační vazby cysteinu a zinečnatého kationtu, druhým krokem je finální odštěpení propeptidu, obvykle zajištěné nějakou jinou MMP. Výsledkem je maturovaný enzym. V mnoha případech se MMP nemohou účastnit reakce, dokud poslední část propeptidu není odstraněna. U MT-MMP a stromelysinu-3 je aktivní místo enzymu vytvářeno přímo po předchozí interakci 11 residuí obsahujících konsensus RXXR (kde X může být jakákoliv aminokyselina) s furinovou rodinou enzymů – s endopeptidázami asociovanými

s Golgiho aparátem. Intracelulární štěpení MT-MMP a stromelysinu-3 furinu podobným enzymem vede k přímé expresi aktivního enzymu (Suzuki et al., 1997).

Existují i **alternativní cesty aktivace MMP**. MT1-MMP je jako neaktivní zymogen umístěn na membránách buněk. Želatináza A (MMP-2) a kolagenáza-3 mohou být aktivovány extracelulárně na povrchu buněk aktivní membránově vázanou MMP, která v tomto případě splňuje funkci enzymu i membránového receptoru. Tento aktivační proces vyžaduje aktivní MT1-MMP a vazbu TIMP-2 na MT1-MMP (Okada et al., 1990, Strongin et al., 1995, Sato et al., 1996).

1.2.4.3. INHIBICE MMP PROSTŘEDNICTVÍM TIMP

Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP) jsou hlavní **endogenní regulátory** MMP ve tkáni. Jsou to proteiny o velikosti 21 - 30 kDa (Obrázek 8). Byly popsány 4 homologní molekuly označované jako TIMP-1, -2, -3, -4 (Tabulka 5). Vážou se s MMP v poměru 1:1, tvoří binární nekovalentní komplexy s velmi vysokou K_d (10^{-9} - 10^{-10}). Blokují tak vazebná místa pro štěpené substráty (Murphy, 1995).

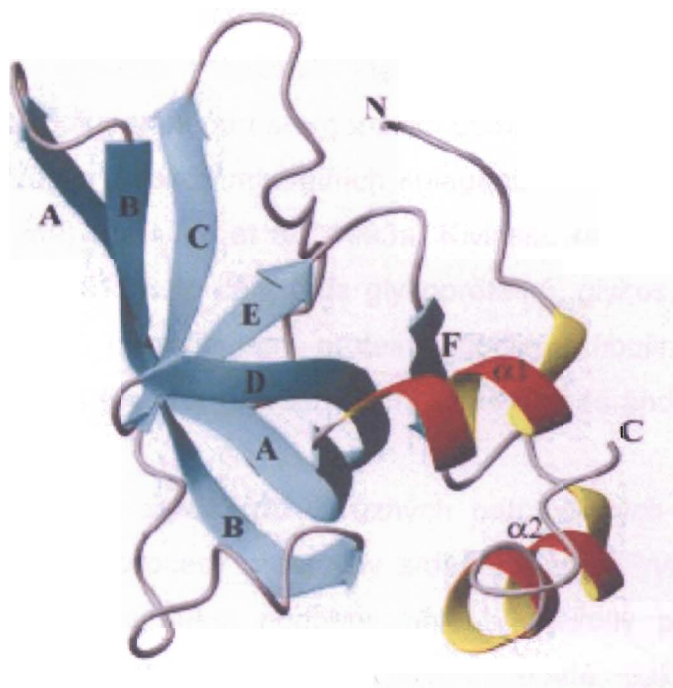
Tabulka 5: Nomenklatura, klasifikace a vlastnosti tkáňových inhibitorů matrixových metaloproteináz (převzato z literatury (Kerrigan et al., 2000))

Inhibice MMP	TIMP-1 Inhibice všech MMP vyjma MMP-14	TIMP-2 Inhibice všech MMP	TIMP-3 Inhibice MMP-1, -2, -3, -9, -13 a TNF konvertujícího enzymu	TIMP-4 Inhibice MMP-1, -2, -3, -7 a -9
Nejefektivnější inhibice	MMP-1	MMP-2 a MMP-9	?	MMP-2 a MMP-7
Srovnání s jinými MMP	2 x účinnější	10 x účinnější		
Hmotnost (kDa)	28,5	21,0	21,0	22,0
Aminokyselinová sekvencí homologie s jinými TIMP	42 % s TIMP-2		27 % s TIMP-1	51 % s TIMP-2 a TIMP-3
Glykosylace	ano	ne	ano	ne
Lokalizace	difuzibilní	difuzibilní	ECM vázaný	difuzibilní
Genová lokalizace	Xp11.23-11.4	17q2.3-2.5	22q12.1-13.2	?
Exprese	inducibilní	konstitutivní	inducibilní	?
Hlavní tkáň	kost, ovária	placenta	ledviny, mozek	srdce
Tvorba komplexů	ProMMP-9	ProMMP-2, MT1-MMP	ProMMP-2, MT1-MMP, ECM	?

TIMP-1 tvoří komplex přednostně s MMP-9, zatímco **TIMP-2** přednostně s MMP-2. Krystalická struktura komplexu budovaná mezi TIMP-1 a katalytickou doménou MMP-3 byla již popsána: kritická místa v celém procesu inhibice jsou lokalizována kolem disulfidické vazby v poloze Cys¹ a Cys⁷³ (Springman et al., 1990). N-terminální α -amino skupina a karbonylová skupina na Cys¹ vazebně koordinují katalytický zinek. TIMPy tak zabraňují autokatalytickému štěpení molekuly MMP vedoucím ke vzniku aktivní molekuly (mechanismus cysteinového sepnutí). TIMPy se v komplexech s jinými molekulami podílejí na inhibici již aktivních MMP, jak je to známo u membránově vázaných MMP. Katalytické množství MMP-3 výrazně aktivuje proMMP-9 bez přítomnosti TIMP-1, ale nikoliv komplex [proMMP-9-TIMP-1] (Kolkenbrock et al., 1991, Kolkenbrock et al., 1994). Pokud je vytvořen **ternární komplex** [proMMP-9-TIMP-1-MMP-3], interakce mezi proMMP-9 a TIMP-1 slábne a částečně disociuje na volné proMMP-9 a komplex [TIMP-1-MMP-3]. K aktivaci proMMP-9, která je inhibována pomocí TIMP-1, je tedy potřeba vyšší koncentrace MMP-3, TIMP-1 však musí být saturován jiným matrixinem (Ogata et al., 2001). To vysvětluje, jak je narušení inhibice MMP zprostředkováná TIMPy. Exprese TIMP-1 a TIMP-2 je odlišně regulovaná cytokiny (TNF- α), které mohou modifikovat expresi TIMP-1 přes indukci jaderných transkripčních faktorů. Exprese TIMP-2 stimulací cytokiny neprobíhá (Ries and Petrides, 1995, Fabunmi et al., 1996).

TIMP-3 byl zjištěn v myokardu myšního embrya, podílí se pravděpodobně na embryonální remodelaci ECM a vývoji srdce (Apte et al., 1994). Liší se od ostatních TIMPů tím, že je přímo vázán na komponenty ECM (TIMP-1 a TIMP-2 jsou volně difuzibilní v intersticiálním prostoru). TIMP-3 proto lépe moduluje aktivitu MMP než ostatní TIMPy (Anand-Apte et al., 1996). **TIMP-4** byl detekován v nízkých koncentracích v ledvinách a tlustém střevě, chybí v plicích, játrech a mozku. Naproti tomu vysoká exprese TIMP-4 byla zjištěna v srdci (Tummalapalli et al., 2001). TIMPy vykazují i jiné biologické funkce. TIMP-1 a TIMP-2 mají mitogenní aktivitu v různých typech buněk, TIMP-2 ovlivňuje i interakci (adhezi) mezi substráty a buňkou (Hayakawa et al., 1992, Hayakawa et al., 1994). Nadprodukce TIMPů brzdí růst tumorových buněk. Pokles koncentrace TIMPů v remodelačních procesech během hojení poškozené tkáně zvyšuje kolagenolytickou aktivitu, stejně jako snížení koncentrace TIMPů umožňuje tumorovým buňkám narušit mimobuněčnou okolní hmotu a migrovat tak do sousedních tkání. Je proto jasné, že regulace rovnováhy mezi kolagenázami a jejich inhibitory je nezbytná pro

remodelaci tkáně, její narušení může významně změnit funkční charakteristiky tkáně (Ponton et al., 1991).



Obrázek 8: Struktura TIMP-1

1.2.5 MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A ONEMOCNĚNÍ MYOKARDU

1.2.5.1. STRUKTURA A FUNKCE ECM MYOKARDU

Srdeční tkáň se skládá ze dvou základních složek – buněčné a mimobuněčné. Dvě třetiny celkového objemu tkáně náleží myocytům, jednu třetinu buněčné hmoty zaujímají jiné buňky - fibroblasty, endotelové buňky, další buňky a nebuněčné složky - tkáňový mok a extracelulární matrix. Patologické změny jsou na molekulové úrovni charakterizovány změnou kvalitativního a kvantitativního složení ECM i složení myocytů. Ty jsou výsledkem remodelace tkáně, tedy i změněné syntézy, degradace, maturace a inkorporace jednotlivých složek ECM, které tvoří velmi organizovanou strukturu s funkcí nejen strukturální, ale i regulační a komunikační (Weber et al., 1994, Maisch, 1996, Tyagi, 1997). Pomalý metabolický **obrat extracelulární hmoty** je charakteristický pro zdravou

srdeční tkáň: syntéza a degradace jsou v dynamické rovnováze. Strukturální páteří ECM myokardu je fibrilární kolagenní síť tvořená především kolageny typu I a III, které jsou extrémně rigidní vůči proteolytickému štěpení. ECM myokardu však obsahuje i složky zastoupené v menším množství, které propojují jednotlivé komponenty, komunikují s myocyty, moduluji transport a organizaci ECM či jednotlivých složek, ovlivňují buněčnou signalizaci. Vedle různých minoritních kolagenů (kolagen typu IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XV, XVIII a jiné) (Pelouch et al., 1993a, Kivirikko et al., 1995, Schacherer et al., 1999, Eklund et al., 2001) je to celá řada glykoproteinů, glykosaminoglykanů (heparansulfát a chondroitinsulfát), mikrofibrilární proteiny (fibrilin a fibulin), laminin, fibronektin, elastin, integriny, tenasciny a jiné (Weber et al., 1994, Jones and Jones, 2000, Ross and Borg, 2001).

Remodelace myokardu v různých patologických situacích je charakterizována několika odlišnými procesy přestavby srdeční tkáně. *První proces*, charakteristický pro infarkt myokardu, je velmi podobný hojení jakékoliv poškozené tkáně. Probíhá po předchozím ischemickém poškození původní tkáně, pak následují reparační procesy, které odstraní nekrotickou tkáň a nahradí ji novou. *Druhý proces* je výsledkem dlouhodobé reakce srdeční tkáně na objemové nebo tlakové zatížení. Přestavba tkáně tak umožňuje udržovat funkci srdce i při změnách tlakových a objemových podmínkách. Je to kvalitativní a kvantitativní přeměna komponent ECM. Jindy dochází naopak díky zvýšené aktivitě enzymů k degradaci ECM a jejímu úbytku, výsledkem je vždy myokard s abnormální strukturou ECM.

1.2.5.2. ÚLOHA MMP V ISCHEMICKÉ SRDEČNÍ TKÁNI

Vlivem **proteolytického a redoxního inzultu** v akutní ischemické fázi dochází k aktivaci MMP, které rozrušují ECM v místě ischemického poškození. Mění se i koncentrace TIMP. Později jsou koncentrace inhibitorů MMP sníženy, a tak složky ECM nadále degradovány. To vede k dilataci a případně systolickému selhávání. V místech vzdálených od infarktového ložiska syntéza ECM pokračuje, to vede k fibróze a případně diastolickému selhání. Strukturální remodelace tkáně po infarktu myokardu může vést ke vzniku hypertrofie a rozpínání tkáně, to je doprovázeno vznikem fibrózy v neinfarktové části srdce a vznikem dilatace v infarktové části, to vše vede k výslednému srdečnímu selhání (Tyagi et al., 1996a, Kukacka et al., 2005).

Po infarktu myokardu je MMP-1 v srdeční tkáni aktivována proteinázami zánětlivých buněk, zároveň dochází i k výrazné redukci množství přítomných TIMPů (Tyagi et al., 1993b). V ischemické levé komoře u krys byla zjištěna zvýšená kolagenolytická aktivita již 2 dny po podvazu koronární artérie, maxima bylo dosaženo po 7 dnech, pak byl již pozorován pokles aktivity MMP-1 a paralelní nárůst aktivity MMP-2 a MMP-9. Vzrůst exprese mRNA MMP-1 nebyl detekován dříve než po 7 dnech podvazu koronární cévy. Transkripce TIMP mRNA je pozorována již po 6 hodinách, maxima je dosaženo po 2 dnech infarktu. Posttranslační aktivace latentní MMP-1 je v procesu hojení postižené tkáně myokardu důležitější než transkripce příslušné mRNA pro MMP-1. Transkripce MMP-1 nastává až po vyčerpání celého množství latentního enzymu. Syntéza TIMP mRNA je regulována aktivací matrixových metaloproteináz. Rovnováha mezi aktivací kolagenázy a inhibicí TIMP určuje stupeň kolagenolýzy v infarktované tkáni (Cleutjens et al., 1995). MMP-1 není tedy enzym, který je plně zodpovědný za odbourávání kolagenu v ischemickém myokardu. Zde se proto uplatňují jiné enzymy ze skupiny cysteinových proteáz (např. plazmin) nebo lysozomální cysteinové proteázy (např. katepsin G) (Cleutjens et al., 1996). Oddálená reperfuze mění aktivitu MMP v infarktovém ložisku krysího srdce, snižuje se aktivita MMP-1 a MMP-2 (o 50 % a o 60 % po 7 dnech) a MMP-9 (až o 84 % po 48 hodinách) (Carlyle et al., 1997). Naopak skrze iniciované zánětlivé procesy v časně reperfuzi dochází k sekreci části aktivní MMP-9 infiltrujícími neutrofily. Ta je zřejmě aktivační proteázou dalších MMP a proces přestavby infarktického ložiska má odlišný mechanismus. Naopak potlačení zánětlivého procesu je spojeno se zvýšeným rizikem vzniku komorových aneurysmat, srdečních ruptur a smrtí (Lindsey et al., 2001). Uvolňování MMP-2 během reperfuze po ischemii přispívá k srdeční mechanické dysfunkci. Specifická inhibice MMP by mohla být novou strategií při léčení ischemicko-reperfuzního poškození (Cheung et al., 2000). Např. podáváním širokospektrého inhibitoru MMP (CP-471,-474) u myší bylo takto docíleno zamezení časného zvětšení levé komory po experimentálně vyvolaném infarktu myokardu (Rohde et al., 1999).

1.2.5.3. FUNKCE MMP V REMODELACI HYPERTROFICKÉ SRDEČNÍ TKÁŇE

Dlouhodobé tlakové či objemové přetížení srdečního svalu vede k hypertrofii a následné remodelaci srdeční tkáně. Myocyty hypertrofují a paralelně dochází k akumulaci ECM, výsledkem může být **diastolické srdeční selhání**. U spontánně hypertenzních krys při srdečním selhání dochází ke vzrůstu aktivity MMP (např. MMP-2, -9). Některé studie ukázaly, že i celková aktivita MMP u pacientů v poslední fázi kardiomyopatií je zvýšena (Gunja-Smith et al., 1996, Li et al., 1998, Thomas et al., 1998). V selhávajícím lidském srdci dochází k výrazné selektivní redukci exprese tkáňových inhibitorů MMP a k nezávislému nárůstu želatinolytické aktivity prezentované aktivitou MMP-9 (Li et al., 1998). U některých hypertrofických kardiomyopatií byl zjištěn nárůst koncentrace tkáňových inhibitorů až 100krát vyšší vzhledem ke kontrolám (Tyagi, 1998), to poukazuje na výjimečné postavení TIMPů v procesu remodelace tkáně. Je známo, že TGF- β indukuje expresi kolagenů a TIMPů, ale naopak redukuje MMP. Přesto jsou během hypertrofické remodelace profibrotické komponenty zvýšeny. To vede k rozvoji kardiovaskulární fibrózy a diastolické dysfunkce (Tyagi et al., 1996b). V experimentálně vyvolané fibróze myokardu při hypertenzi u krys byl zjištěn nárůst aktivity MMP-2 až po 2 měsících, zatímco aktivita pro MMP-1 se nezměnila (Robert et al., 1997).

1.2.5.4. MMP A DILATAČNÍ KARDIOMYOPATIE

Při dilatačních kardiomyopatiích (DCM) dochází ke slábnutí komorové stěny, myocyty jsou hypertrofované a v ECM vznikají trhliny. Výsledkem je systolické srdeční selhání. Na modelu DCM u křečka bylo demonstrováno, že aktivita MMP vzrostla po 180 dnech a setrvala zvýšená ještě po 310 dnech. Tato zvýšená aktivita MMP byla spojena s redukcí exprese TIMPů (Tyagi et al., 1996c). Podobně i u lidí s DCM je MMP-1 specificky a diferencovaně indukována a produkce TIMPů potlačena. Jsou dva možné výklady: je to buď mutace propeptidové části MMP-1, která vede k produkci již aktivní MMP-1 bez potřeby postranlační aktivace, nebo je to dramatické snížení přítomnosti tkáňových inhibitorů MMP, které je spojeno s předchozí mutací genů pro TIMPy (Tyagi et al., 1998). Kromě MMP-1 dochází i ke zvýšení aktivity MMP-3 a MMP-9. Zvýšená aktivita MMP-3 byla detekována v procesech spojených s dilatací levé komory jak u zvířat tak

u lidí (Spinale et al., 1998, Thomas et al., 1998). U prasat s městnavým srdečním selháním byla aktivita MMP-1 v levé komoře vyšší až o 319 % oproti zdravým, zvýšená byla i aktivita MMP-2 (o 194 %) a MMP-3 (o 493 %) (Coker et al., 1998). V procesu dilatace se také uplatňuje redukce příčněvazebných elementů (cross-link) mezi kolagenními fibrilami. Nově vytvářený kolagen není propojován **cross-linky**. Vytvářejí se kolagenní depozita, která podléhají zvýšenému obratu matrix jako důsledek zvýšené aktivity MMP v procesu dilatace srdeční tkáně. Zajímavým zjištěním bylo, že v lidské srdeční tkáni u DCM byla nalezena vyšší aktivita neutrofilové kolagenázy (MMP-8), která však nepocházela z neutrofilů, ale z jiných buněk, zřejmě ze samotných myocytů (Gunja-Smith et al., 1996). Na degradaci fibrilárního kolagenu se podílí i MMP-13, její zvýšená aktivita v myokardu byla nalezena u 13 měsíců starých hypertenzních krys s progresivním levostranným srdečním selháním (Peterson et al., 2001). U krys se symptomatickým městnavým srdečním selháním docházelo k signifikantnímu vzrůstu aktivity MMP. V tomto experimentu bylo dále prokázáno, že k ventrikulární dilataci může docházet i přesto, že syntéza kolagenu výrazně převyšuje jeho degradaci. Je zřejmé, že koncentrace celkového kolagenu není zodpovědná za proces ventrikulární compliance, významnou roli však hraje pokles interakce kolagenu s integrinovými receptory, změněné příčně vazebné propojování kolagenů nebo vnitřní změny v architektuře kardiomyocytů (Brower and Janicki, 2001).

1.2.5.5. SYNTETICKÉ INHIBITORY MMP A MOŽNOSTI TERAPIE KARDIOMYOPATÍ

V posledních letech je soustředěno velké úsilí o vývoj účinného specifického inhibitoru MMP. Idea terapie některých onemocnění pomocí inhibice MMP vzešla především z oblasti nádorových onemocnění. Novotvary produkují ohromné množství destruktivních MMP, které rozrušují okolní zdravou tkáň a zajišťují tak nekontrolovatelný růst nádoru (Stetler-Stevenson and Yu, 2001, Fingleton, 2007). Je oprávněné se domnívat, že inhibice MMP může mít i uplatnění při onemocnění kardiovaskulárního systému. V 70. letech byly objeveny první syntetické inhibitory MMP, desítky z nich byly použity v různých experimentálních modelech, ale jen zhruba 56 z nich bylo označeno za vhodné kandidáty pro další klinické testy. Hlavními oblastmi jejich terapeutické indikace byly nádorová onemocnění (24 inhibitorů) a artritida (27 inhibitorů). 10 inhibitorů bylo vybráno pro

kardiovaskulární onemocnění (Tabulka 6). U 46 inhibitorů byly z různých důvodů přerušeny klinické zkoušky, 7 ostatních stále zůstává ve fázi klinických testů a pouze jediný inhibitor byl úspěšně zaregistrován jako lék proti onemocněním periodontu (Periostat®). Jedním z hlavních důvodů, proč inhibitory MMP selhávají v klinických testech, je neadekvátní stanovení terapeutického indexu (Peterson, 2006).

Syntetické inhibitory MMP je možno podle chemického charakteru rozdělit do 4 významných skupin: a) peptidomimetické b) nepeptidomimetické c) deriváty tetracyklinů d) bifosfonáty. Struktury některých z nich jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 9).

Tabulka 6: Přehled syntetických inhibitorů MMP s kardiovaskulárními indikacemi (upraveno podle J.T. Petersona, 2006)

Název produktu nebo sloučeniny	Tvůrce/držitel licence	Indikace
PD166793	Pfizer (Parke-Davis)	Systolické srdeční selhání
CP-471474	Pfizer	Postischemická remodelace myokardu
RS-11-3456	Roche	Aortální aneuryzma a artritida
Batimastat	British Biotech	Restenóza stentů (studie BRILLIANT-EU)
RS-132908	Roche	Systolické srdeční selhání
PG-166800	Procter and Gamble	Postischemická remodelace myokardu (studie PREMIER)
MT1-MMP inhibitory	3-D Pharmaceuticals	Restenóza a ateroskleróza
KB-R-7785	Kanebo	Srdeční hypertrofie z tlakového přetížení a dekompenzace vedoucí k systolickému selhání srdce
Nephrostat CMT	CollaGenex	Aortální aneuryzma
Doxycyklin	Washington University	Aortální aneuryzma
Periostat® Doxycyklin	MIDAS Study Group	Akutní koronární syndrom (studie MIDAS)

Kromě zde popisovaných syntetických inhibitorů existuje celá řada přírodních látek, které účinkují jako inhibitory MMP. Patří sem například tetracykliny, pyknidion, neovostat, squalamin, genistein, nobiletin, myricetin, kurkumim, xanthorizol, theaflavin, resveratrol, aktinonin, BE-166278 (banyu), matlystatin B, nikotinamid, kyselina betulinová, kyselina glycyretinová, rifampicin, deriváty katechinů a řada derivátů futoenonu. Není zcela jasné, jak tyto přírodní látky interagují s molekulou MMP. Pravděpodobně přítomnost kruhově uspořádaných hydroxylových nebo karbonylových skupin v jejich molekulách je schopna chelatovat zinek v aktivním místě enzymu (Verma and Hansch, 2007).

1.2.5.5.1. PEPTIDOMIMETICKÉ INHIBITORY MMP

První syntetické inhibitory MMP (peptidomimetické) byly vyvinuty na základě znalosti sekvence místa štěpení kolagenní molekuly pomocí MMP-1. Tyto inhibitory obsahují chelatační skupinu vážící zinek v aktivním místě MMP. Takový je inhibitor BB-94 (batimastat) (Botos et al., 1996), který inhibuje pravou část štěpícího místa. Ty, které byly navrženy ze znalosti sekvence levé části štěpícího místa MMP, jsou slabší (Whittaker et al., 2001). Pro udržení konstantní struktury těchto inhibitorů byla zvolena tzv. **hydroxamátová struktura**. Hydroxamát slouží jako účinný ligand zinečnatého kationtu v aktivním místě MMP, a to všemi svými kyslíky v optimální vzdálenosti a dusíkem, který je protonován a tvoří vodíkové vazby s karbonylovým kyslíkem enzymové páteře. Modifikace postranního řetězce hydroxamátu (např. sukcinátem) zvýšila inhibiční efektivitu těchto sloučenin. Skupina těchto inhibitorů (např. BB-94 nebo BB-1101) má širokou substrátovou specifitu. Dále bylo snahou vyvinout sloučeninu, která by inhibovala zároveň pravou část aktivního místa i levou část aktivního místa enzymu (např. SE205) (Xue et al., 1998).

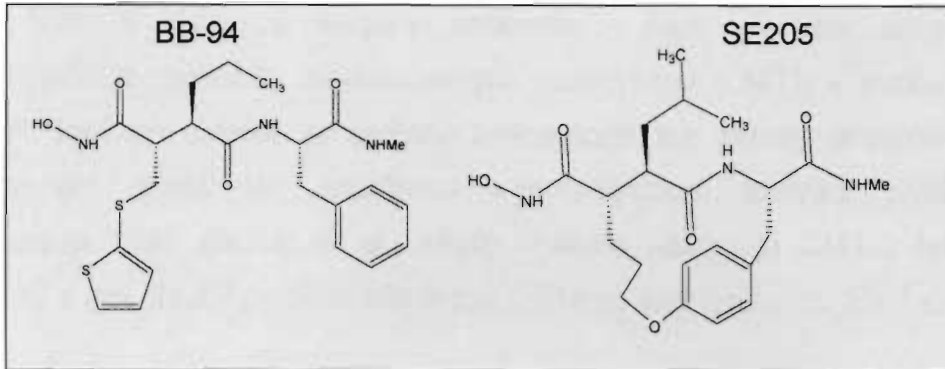
Peptidomimetické inhibitory se staly zřejmě nejpoužívanějším nástrojem inhibice MMP v experimentální kardiologii. Podávání batimastatu ovlivnilo proteinovou remodelaci myokardu při dlouhodobé expozici potkana chronické hypoxii (3 týdny). Kromě změn v proteinovém složení tkáně došlo i k redukci aktivity některých MMP a jejich proenzymů (Kukacka et al., 2000). Podobné výsledky popisují i jiní autoři. Redukce exprese kolagenů, zvýšení podílu nerozpustných kolagenů a proporce nedenaturovaných kolagenních proteinů k celkovému rozpustnému kolagenu. Batimastat zabraňoval dále rozvoji hypertrofie myokardu a diastolickým dysfunkcím u mladých transgenních myší se zvýšenou expresí TNF- α (omezenou na myokard) a takto vyvolaným srdečním selháním (Li et al., 2002).

1.2.5.5.2. NEPEPTIDOMIMETICKÉ INHIBITORY MMP

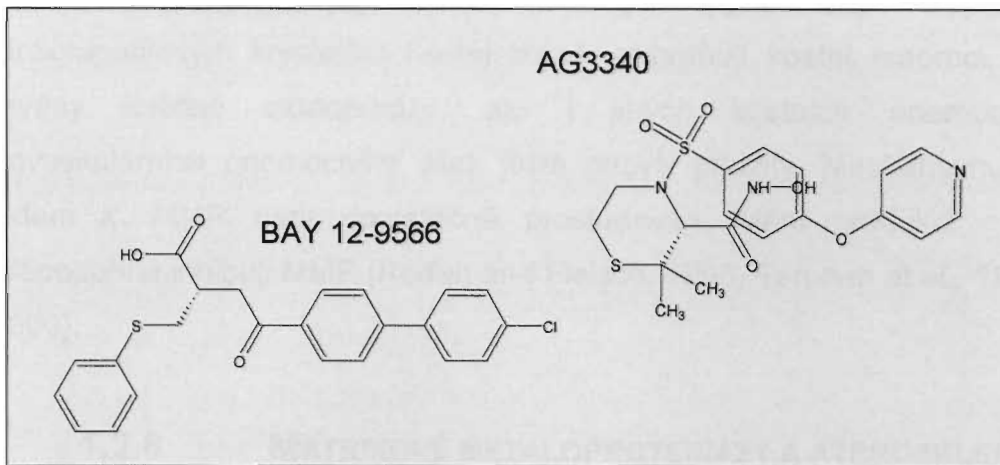
Do skupiny nepeptidomimetických inhibitorů patří např. N-sulfonyl aminokyselinové hydroxamáty, které byly připraveny pro orální podávání, patří sem např. CGS27023A nebo AG3340. Mají **široké inhibiční spektrum**. Jsou to i nedávno vyvinuté arylhydroxymátové sloučeniny, u nichž se zatím testují případné mutagenní účinky.

Jinými nehydroxamátovými alternativami syntetických inhibitorů jsou karboxylové kyseliny a thiolové sloučeniny schopné se vázat na vazebné místo pro zinek v katalytickém centru MMP (Heath and Grochow, 2000). Takovým příkladem je BAY 12-9566, bifenylový derivát protizánětlivého léku fenbufen (Heath et al., 2001). Z karboxylátů je v experimentálních studiích úspěšně používán inhibitor PD166793. Podáváním tohoto inhibitoru se podařilo u prasat s městnavým srdečním selháním zmírnit dilataci a remodelaci levé komory (Spinale et al., 1999). Stejný inhibitor zabránil peroxinitrem vyvolané ztrátě srdeční mechanické funkce (Wang et al., 2002a). Selhávající srdce u spontánně hypertenzních krys léčených pomocí PD166793 mělo redukovaný objem levé komory v porovnání s neléčenými zvířaty a hodnota vrcholu $+dP/dt$ byla porovnatelná s hodnotou u kontrolních zvířat (Peterson et al., 2001). V jiném experimentu u spontánně hypertenzních krys byla použita inhibice MMP pomocí PD166793 a zároveň ACE inhibitor (quinapril). Obojí působení inhibitorů redukovalo levokomorovou dilataci, udrželo systolickou funkci, normalizovalo expresi MMP/TIMP a redukovalo objem kolagenní frakce (Li et al., 2000a). Thiolové skupiny, díky své schopnosti vázat zinek v aktivním místě, jsou vhodné molekuly pro inkorporaci do molekul MMP inhibitorů. Přestože skutečná afinita „jednozubých“ thiolových skupin je menší než „dvouzubých“ karboxylátů nebo hydroxamátů, snadnější rozpuštění a ionizace vyrovná jejich výslednou inhibiční potenci (Hidalgo and Eckhardt, 2001b, Hidalgo and Eckhardt, 2001a).

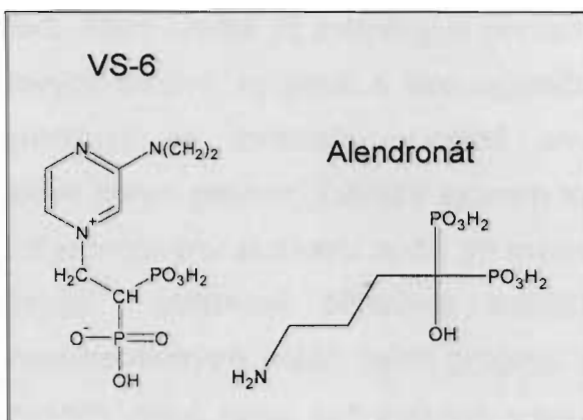
Peptidomimetické inhibitory



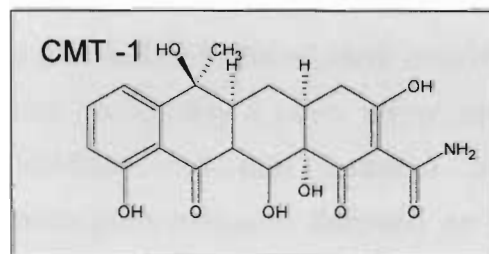
Nepeptidomimetické inhibitory



Bifosfonáty



Modifikované tetracykliny



Obrázek 9: Struktura syntetických inhibitorů MMP

1.2.5.5.3. DERIVÁTY TETRACYKLINŮ

Některé látky ze skupiny antibiotik – např. deriváty tetracyklinů (doxycyklin, minocyklin a chemicky modifikovaných tetracyklinů (CMT)) – inhibují aktivitu i produkci MMP. Inhibiční účinek je zajištěn blokováním jak aktivity enzymu chelatací zinku ve vazebném místě tak interferací s proteolytickou aktivací proMMP; redukuje se i exprese MMP (Golub et al., 1998). Zvláště účinný je CMT-3 (metastat), který není toxický a má dlouhý poločas eliminace (Hidalgo and Eckhardt, 2001a).

1.2.5.5.4. BIFOSFONÁTY

Bifosfonáty jsou syntetická analoga pyrofosfátu s vysokou afinitou k hydroxyapatitovým krystalům kostní tkáně, zabraňují kostní resorpci. Jsou úspěšně používány k léčbě osteoporózy, ale i jiných kostních onemocnění. V léčbě kardiovaskulárních onemocnění však ještě nebyly použity. Mechanismus jejich účinku vzhledem k MMP není dostatečně prostudován. Mění produkci cytokinů, a tak pravděpodobně inhibují MMP (Rodan and Fleisch, 1996, Teronen et al., 1999, Ichinose et al., 2000).

1.2.6 MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY A ATEROSKLERÓZA

Vznik a rozvoj aterosklerózy je ovlivněn souhrou a interakcí mnoha rozličných faktorů, které kromě již zmíněných poruch metabolismu lipidů zahrnují změny v expresi růstových faktorů, cytokinů a vasoregulačních faktorů, které regulují funkce buněk cév v souvislosti se změnami v intimě cévy, extracelulární matrix, krevních buněk a složek krevní plazmy. Zvláštní význam tu má především extracelulární matrix, která se svými jednotlivými složkami podílí na mechanické opoře cévy a cévní stěny, ale zároveň ovlivňuje i vlastnosti přilehlých buněk. Důležitou roli pak sehrává při vzniku **aterosklerotických plátů**, jejich progresi a následném rozpadu. Zároveň se při těchto procesech mění jejich koncentrace v krevním řečišti, a proto se o některých z nich uvažuje jako o vhodných markerech rizika vzniku a rozvoje aterosklerózy (Katsuda and Kaji, 2003).

Ukázalo se, že samotné **lipoproteiny** modulují expresi a aktivitu matrixových metaloproteináz. Tak například oxidovaný LDL zvyšuje expresi MMP-1 endotelových

buněk, a protože MMP-1 degraduje kolagen, může oxidovaný LDL tímto mechanismem destabilizovat aterosklerotický plát. Oxidovaný, nikoliv nativní LDL, stimuluje také produkci MMP-9 makrofágy a zároveň redukuje expresi TIMP-1 (Chait and Wight, 2000). Časná migrace a proliferace těchto buněk v médii cévy je spojena s vyšší expresí a aktivitou MMP.

Jiný významný vliv na rozvoj aterosklerotických lézí mají **buňky zánětlivých procesů**, které interagují s adhezivními molekulami exprimovanými aktivovaným endotelem. V těchto procesech infiltrují leukocyty vrstvu endotelu a spojují se s bazální membránou po jejich adhezi. Poslední studie ukázaly, že při této infiltraci a adhezi se uplatňují opět MMP, zvláště pak MMP-2 a MMP-9. Degradace endotelových buněk bazální mebrány pomocí matrixových metaloproteináz během diapedézy zánětlivých buněk přispívá k poklesu obranné funkce endotelu a následnému influxu plazmatických proteinů včetně lipoproteinů. Infiltrované buňky interagují s ECM, oxidovanými proteiny a samy navzájem mezi sebou. Všechny tyto interakce způsobují zvýšenou produkci MMP makrofágy. Makrofágy jsou také schopny ovlivnit stimulaci produkce MMP okolními buňkami, a to mechanismem aktivujícím zymogeny MMP. Zvýšená aktivita MMP v rozvíjející se aterosklerotické lézi může zjednodušit další strukturální změny a růst (Newby, 2005). Stručný přehled MMP, které jsou produkovány zánětlivými buňkami v místě aterosklerotických plátů, jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 7).

Klinické projevy aterosklerózy jsou spojovány s patrnými morfológickými změnami v postižených artériích, jako stenóza cévy omezující tok s výslednou klaudikací nebo stabilní anginou nebo aneuryzmální dilatace vedoucí k ruptuře cévy. Současné pojetí patogeneze aterosklerózy klade důraz na objasnění procesů souvisejících s remodelací cévní stěny, snaží se zodpovědět otázky, jak se může oslabení a destabilizace cévní stěny, většinou angiograficky nedetekovatelné, podílet na akutním koronárním syndromu. V těchto souvislostech jsou studovány právě MMP, jednak v místě postižené cévy a jednak cirkulující (Galis and Khatri, 2002).

Tabulka 7: Buněčné zdroje matrixových metaloproteináz v aterosklerotickém plátu

Systematické označení	Triviální název	Buněčné zdroje enzymu v aterosklerotickém plátu
MMP-1	kolagenáza 1	makrofágy, buňky hladkého svalu, buňky endotelu
MMP-8	kolagenáza 2	neutrofil, makrofágy, buňky hladkého svalu, buňky endotelu
MMP-13	kolagenáza 3	makrofágy, buňky hladkého svalu, buňky endotelu
MMP-2	želatináza A	buňky hladkého svalu, makrofágy, endotelové buňky, T lymfocyty
MMP-9	želatináza B	makrofágy, buňky hladkého svalu, endotelové buňky, T lymfocyty
MMP-3	stromelysin 1	makrofágy, buňky hladkého svalu
MMP-14	membránová MMP 1	buňky hladkého svalu, buňky endotelu, makrofágy
MMP-7	matrylsin	makrofágy
MMP-12	metaloelastáza	makrofágy

1.2.6.1. VYUŽITÍ MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ V KLINICKO-BIOCHEMICKÉ DIAGNOSTICE HYPERLIPIDÉMIÍ A ATEROSKLERÓZY

V klinické laboratorní diagnostice se zatím stanovení matrixových metaloproteináz nepoužívá. MMP se studují potenciálními dobrými markery některých tumorových, neurodegenerativních, imunitních a kardiovaskulárních onemocnění. Jejich zavedení do klinicko-biochemické diagnostiky především brání **nedostatek standardizovaných analytických procedur** včetně nevyjasněných otázek týkajících se povahy vyšetřovaného materiálu (sérum nebo plazma), povahy měřené molekuly MMP (celková MMP, nekomplexovaná MMP nebo proMMP?) a detekčních limitů zatím komerčně dostupných metod. V současné době imunochemické metody vytlačují enzymatické, ale ty zároveň nejsou schopny rozlišit mezi zymogenem a aktivním enzymem (Lombard et al., 2005). Zdá se, že v problematice MMP dochází opět k návratu k metodám, které jsou schopny určit aktivitu enzymu. Ty je možno rozdělit na metody:

- používající proteiny (modifikované nebo nemodifikované)
- používající syntetické lineární peptidy a jejich deriváty
- používající syntetické „mini-kolageny“.

Přestože existuje celá řada experimentálních prací o úloze MMP v rozvoji aterosklerózy, v dostupné literatuře je zatím omezené množství studií, které dokumentují vztah cirkulujících MMP a různých poruch lipidového metabolismu u člověka. Bylo

prokázáno, že plazmatická koncentrace MMP-3 anebo MMP-9 jsou významně vyšší u vysoce rizikových hyperlipidemických pacientů (s jedním nebo více jiných rizikových kardiovaskulárních faktorů kromě hyperlipidémie) v porovnání s normolipidemickými pacienty (Beaudeau et al., 2003). V prospektivní studii 1127 pacientů s prokázanou chorobou koronárních artérií byly nalezeny vyšší plazmatické hladiny MMP-9 u těch, kteří zemřeli, v porovnání s přeživšími (Beaudeau et al., 2004). U pacientů s **familiární hypercholesterolemií**, kteří nikdy nebyli léčeni hypolipidemiky jsou výrazně vyšší hladiny cirkulující MMP-9, a to jak u heterozygotů, tak homozygotů (El Messal et al., 2006). Izolovaná hypercholesterolemie *per se* je spojená s podobnými změnami cirkulujících MMP a TIMP jako u symptomatické aterosklerózy. U 27 pacientů byly hladiny cirkulující MMP-3 nižší v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace MMP-2 a MMP-9 se však významně nelišily (Malik et al., 2005).

1.2.7 **MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY V KLINICKO-BIOCHEMICKÉ DIAGNOSTICE KRANIOCEREBRÁLNÍHO PORANĚNÍ**

Většina kraniocerebrálních poranění hlavy je způsobena **kontaktním mechanismem** při nárazu pohybujícího se předmětu do hlavy nebo pohybující se hlavy na pevný předmět (kontaktní mechanismus) nebo mechanismem akcelerace a decelerace při prudkém pohybu hlavy (inerciální poranění). Velmi často jsou postiženy čelní a spánkové laloky **difuzním axonálním poraněním** (DAI). Primární poranění hlavy vznikají jako výsledek působení mechanických sil vedoucích k deformaci mozkové tkáně v okamžiku úrazu. Přitom může dojít k přímému fokálnímu, multifokálnímu nebo difuznímu poranění cév, axonů, neuronů a glie. Sekundární poškození vznikají jako rozvíjející se komplikace různých typů primárního poranění, kdy dochází k bezprostřednímu selhání intrakraniální cévní autoregulace (Imajo and Kazee, 1992, Vajtr et al., 2006). Vzniká ischemicko-hypoxické poškození, zduření mozku, projeví se následky zvýšeného nitrolebního tlaku, sekundární hydrocefalus, infekce a sekundární poškození axonů. Konečným výsledkem kraniocerebrálního poranění je destrukce buněčné membrány se ztrátou funkce a integrity neuronu až do nejzávažnější vývojové fáze poranění tzv. traumatického apatického syndromu.

Během **hemoragické cévní mozkové příhody** se uvádí zvýšená endogenní produkce MMP-9. U diagnózy neúrazového krvácení do mozku je maximum produkce

MMP-9 mezi 16. a 24. hodinou po vzniku krvácení (Rosenberg, 1995). U ischemického lokálního infarktu se zvyšuje aktivita MMP-9 produkovaná buňkami hematoencefalické bariéry. MMP-9 aktivita byla pozorována po 12 hodinách od hypoxického infarktu, maximum bylo po 24 hodinách, perzistující hladiny po dobu 5 dnů a k bazálním hodnotám se vrací po 15 dnech (Mun-Bryce and Rosenberg, 1998) . V zóně infarktu je aktivita MMP-2 přítomná v makrofázích, sérové hladiny MMP-2 jsou nižší než u MMP-9. Hemoragická transformace ložiska ischemické ataky podle některých prací nemá souvislost s naputováním neutrofilních polymorfonukleárů do poškozeného ložiska (Harris et al., 2005). Po embolickém infarktu mozku zůstávají hladiny MMP-9 v séru několikanásobně zvýšené po 1. dni a zůstávají elevované 12 dnů. Vyšší hladiny MMP-9 nacházíme u pacientů léčených trombolýzou, středně vysoké u léčených heparinem a nejnižší u pacientů léčených řízenou hypotermií (Vajtr et al., 2006) .

1.3. METALOTHIONEIN

Metalothionein má mnoho biologických funkcí, mezi ty hlavní patří 1) imunoregulační 2) neuroprotektivní 3) metaloregulační 4) detoxikační (vychytávání volných kyslíkových radikálů, eliminace těžkých kovů z organismu). Zájem o metalothionein však vzrůstá také díky tomu, že je to perspektivní **onkomarker**. Mnoho studií prokázalo, že se MT vyskytuje nebo že je jeho syntéza zvýšena v normálních proliferujících buňkách, obnovujících se buňkách a nádorových buňkách. Byl prokázán přímý vztah mezi expresí MT proteinu a agresivním neoplastickým růstem buněk. Díky své nukleofilitě MT chrání buňky před cytotoxickým efektem elektrofilních protinádorových léčiv (Thirumorthy et al., 2007). Současné studie poukazují na to, že zvýšená exprese MT v buňkách indukuje **antiapoptický efekt** a nedostatek MT v buňkách s chybějící syntézou MT zvyšuje jejich náchylnost k programované smrti poté, co jsou vystaveny působení protinádorových léků (Abdel-Mageed and Agrawal, 1997, Abdel-Mageed and Agrawal, 1998). MT hraje důležitou roli v procesech detoxikace těžkých kovů; zároveň existují práce dokazující jeho schopnost vychytávat reaktivní kyslíkové radikály, částečně i hydroxylové radikály. Tyto částice se normálně uvolňují v průběhu aerobních procesů, ale stávají se noxou v situacích nerovnováhy endogenních antioxidantů. V těchto případech pak poškozují DNA, indukují peroxidaci lipidů, oxidují enzymy atd. To vše vede k destrukci buňky, chromozomálními aberacím a konečně k nádorovému bujení (Janssen et al., 2002). MT byl zařazen k potenciálním prognostickým markerům invazivních duktálních karcinomů mamy, kůže, cervixu a pankreatu (Thirumorthy et al., 2007). Nepravidelný růst buněk způsobený zvýšenou buněčnou proliferací nebo poruchou buněk uskutečnit apoptózu je považován za hlavní faktor maligních procesů. Metalothioneiny mají jistou **duální funkci**. Jednak ovlivňují růst a přežití tumorových buněk, protože jsou to tzv. **metaloregulátory** **funkcí** v procesech buněčných oprav, růstu a diferenciaci, a zároveň mají protektivní funkci při oxidačním stresu, tedy chrání buňku před apoptózou, která je vyvolaná generací volných radikálů v buňce. MT může být indukován celou řadou endogenních i exogenních stimulů, jako jsou glukokortikoidy, interferon, interleukin-1, progesteron, vitamín D₃, endotoxiny a těžké kovy, ukládání kovových iontů a hospodaření s buněčným zinkem (Tan et al., 1999). Vysoká exprese MT, tak jak to ukázaly některé studie, je příčinou

chemorezistence v léčbě mnoha typů nádorových onemocnění. Léky a jejich metabolity jsou vychytávány MT dříve než mohou působit v místě jejich určení (Kizek et al., 2004).

1.3.1 METALOTHIONEIN A CHRONICKÉ INTOXIKACE

MT je především spojován s toxikokinetikou a biochemií stopových prvků, jako je zinek, měď, selen nebo bizmut. Významnou roli hraje v **detoxikaci těžkých kovů**, především rtuti, olova a zvláště pak kadmia (Nordberg and Nordberg, 2000). Vztah kadmia a MT velmi dobře vysvětluje, jak je tento kov vychytáván ze tkání a účinně dopraven do ledvin, kde je z těla vyloučen. Tento mechanismus je podobný i pro jiné kovy, které je nutno eliminovat z tkání a z lidského těla (Jarup, 2002). Je zajímavé a dosud nevysvětlené, proč je protektivní efekt thioneinu nejvyšší právě u kadmia a nikoliv u mědi nebo rtuti, které k němu mají vyšší afinitu. Uvádí se, že až 7 % populace je náchylná k onemocnění ledvin skrze environmentální kontaminaci kadmíem (Jarup et al., 1998). Někteří jedinci mají dokonce geneticky danou sníženou schopnost syntetizovat MT a tedy latentní abnormality ledvinových funkcí, které se mohou projevit až při dlouhodobě nízké expozici Cd (Yoshida et al., 1998). Letální toxicita arzenu je kromě jiného přisuzována i tomu, že se As neváže na MT. Ovšem na experimentech s MT-null myši bylo prokázáno, že MT snižuje jeho koncentraci nepřímo tím, že se podílí na detoxikaci jiných toxických intermediátů vznikajících As inzultem (Liu et al., 2000a). A to je zřejmě jeho „druhá“ detoxikační aktivita, aktivita velmi **potentního scavengeru volných kyslíkových radikálů** (ROS). Tato jeho funkce byla dobře prozkoumána použitím MT-null myši v experimentu, při kterém tyto myši nejsou schopny syntetizovat MT-I a MT-II, a MT-Tg myši, které naopak excesivně produkují MT-I a MT-II (Ghoshal et al., 1999). Lazo a kol. ověřili senzitivitu fibroblastů izolovaných z MT-null myši k ROS a ukázali, že MT má aktivitu scavengeru již na buněčné úrovni (Lazo et al., 1995). MT významně snižuje nefrotoxicitu cisplatinu právě vychytáváním ROS, jak to bylo prokázáno u MT-null myši (Sato et al., 2000). Kardiotoxicita doxorubicinu způsobená produkcí ROS byla významně snížena u MT-Tg myši, ale i *in vitro* použitím vyizolovaných buněk z myokardu MT-Tg myši. Tyto myši specificky exprimují MT v místě oxidačního poškození tkáně doxorubicinem, tedy v srdci, MT zde potlačuje vznik produktů lipidové peroxidace a indukci apoptózy buněk myokardu (Wu and Kang, 1998, Kimura et al., 2000). Jiní autoři zjistili aktivaci p38 mitogenně aktivované proteinové kinázy (p38 MAP kináza) během

indukce buněk myokardu doxorubicinem a objasnili její potlačení během suprese apoptózy metalothioneinem (Kang et al., 2000). Všechny tyto výsledky nasvědčují tomu, že MT reguluje intracelulární přenos signálu při regulaci ROS. Navíc MT reguluje aktivaci nukleárního faktoru κB přes $\text{TNF-}\alpha$ a NO signální přenos (Pearce et al., 2000). Jelikož ROS působí jako molekulové poslové vnitrobuněčných signálů, scavengerová aktivita MT může být zřejmě velmi blízká intracelulárnímu signálnímu přenosu.

1.3.2 METALOTHIONEIN A CNS

MT-I a II jsou ve velké míře exprimovány v gliích centrálního nervového systému, ale i v astrocytech bílé hmoty, mohou být tedy syntetizovány kdekoliv v mozku či míše (Penkowa, 2006). Kromě nich se ještě v CNS vyskytuje MT-III, ale nikoliv MT-IV. Vysoká exprese MT v CNS poukazuje na to, že zde slouží jako modulátor kovů a účinná ochrana proti oxidativnímu poškození vyvolanému těžkými kovy (Hidalgo et al., 2001). Zinek je přítomný v presynaptických zakončeních a je známo, že působí nejenom jako neurotransmitter, ale je také uvolňován z buněk mozku při ischemii a poškozuje CNS (Koh et al., 1996). Z tohoto důvodu MT, jako Zn-protein, je velmi důležitý protein CNS. Všechny zmiňované MT jsou potentními scavengery volných radikálů v CNS. Ochranná kapacita proti oxidačnímu stresu byla nedávno ověřena použitím motorických neuronů nadměrně syntetizujících MT-I, které pak *in vitro* dostatečně odolávaly toxinům, jako byl např. paraquat (Taylor et al., 2004, Tomita et al., 2006). MT-I a MT-II knockoutované myši měly v CNS atrofii velkých myelinovaných axonů způsobenou oxidativním stresem komponentů podporujících neurofilamenta, která regulují axonální kalibr při nedostatku protektivního efektu MT (Stankovic and Li, 2006). MT-I a MT-II zmírňují opožděné cerebrální poškození a buněčnou smrt a zároveň se podílejí na regeneraci mozkové tkáně, angiogenezi a funkčním zotavení. U obou MT bylo prokázáno, že působí přímo jako **neurotrofní agens**. Po léčení neuronů exogenními MT-I a MT-II se ukázalo, že oba proteiny ovlivňují přežití neuronů a axonální růst jak v kortikálních, tak v hipokampálních a dopaminergních tkáňových kulturách (Stankovic et al., 2007). Myši bez schopnosti syntetizovat v CNS MT-I a MT-II vykazovaly zhoršenou regeneraci axonů po rozdrčení sedacího nervu a léčba pomocí MT-I a MT-II umožnila axonům se regenerovat s následnou komplexní transekcí zralých axonů *in vitro* (Chung et al., 2002, Chung et al., 2003). MT-III je specificky exprimovaný v mozku a kvantita jeho exprese je redukována

u pacientů s Alzheimerovou chorobou, zřejmě se podílí i na vzniku a rozvoji jiných neurodegenerativních chorob (Sato and Kondoh, 2002). Koncentrace MT v krvi výrazně stoupá u pacientů s traumatickým poškozením mozku a jeho monitorování by mohlo být užitečným nástrojem pro zhodnocení závažnosti poškození tkáně a trvání bezvědomí, částečně při diagnóze difuzního axonálního poškození (Kukacka et al., 2006b).

2. CÍLE PRÁCE

1. Analyzovat změny matrixových metaloproteináz, metaloproteinů a proteinového složení srdečního svalu laboratorního potkana při různých patologických situacích:
 - a) krátkodobé (4denní) a dlouhodobé (21denní) hypoxii
 - b) podávání metamfetaminu

2. Zavést metodiku pro identifikaci a kvantifikaci matrixových metaloproteináz a metalothioneinu v biologických tekutinách; následně stanovit koncentraci těchto látek v séru u pacientů:
 - a) s poruchou lipidového metabolismu
 - b) s traumatickým poškozením mozku

3. METODY

3.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODELY

Všechny procedury se zvířaty byly schváleny Komisí pro práci s laboratorními zvířaty UK 2.LF a v souladu s předpisy Evropské úmluvy o ochraně zvířat.

3.1.1 EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 4DENNÍ HYPOXII A 4DENNÍ HYPOXII S HYPERKAPNÍ

Dvě skupiny dospělého samce laboratorního potkana kmene WISTAR (Anlab, ČR) byly vystaveny hypoxickým podmínkám 10% O₂ v izobarické komoře po dobu 4 dní. Izobarické podmínky byly vytvořeny tak, že chybějící O₂ (cca 11%) byl nahrazen plynným dusíkem.

- a) První skupina (n=12) byla umístěna do izobarické komory s režimem cirkulující směsi plynů, kde CO₂ byl plně absorbován (jeho koncentrace byla neměřitelná) v průtokovém zásobníku s natronovým vápnem (Obrázek 10).
- b) Druhá skupina (n=12) byla umístěna do izobarické komory, kde koncentrace CO₂ v inspirované směsi plynů činila průměrně 4,4 % (rozmezí 4,0 % – 5,2 %). Zvířata byla vystavena těmto podmínkám 4 dny.

Kontrolní skupina (n=12) byla po stejnou dobu chována v normálních atmosférických podmínkách. Izobarická komora nebyla po celou dobu experimentů otevřena. Všechna zvířata měla volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě. Místnost, kde se prováděl experiment, byla klimatizována a teplota byla regulována na 20°C. Zvířata byla usmrcena do 12 hodin po ukončení expozice hypoxii (hyperkapnií). V anestézii (pentobarbital sodný, 50 mg/kg) jim byl otevřen hrudní koš, přestřižena aorta a rychle vyjmuta srdce, poté exsanguinací eutanizována. Aorta a pulmonální artérie byly ze srdce opatrně odstraněny u povrchu komor, pravá a levá komora srdeční byly od sebe

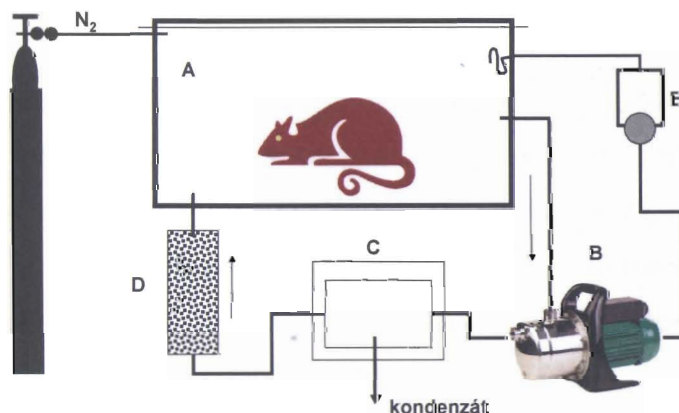
odděleny, vysušeny, zváženy, zmrazeny v tekutém dusíku a do další analýzy uchovány při -70°C .

3.1.2 EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 3TÝDENNÍ HYPOXII ZA SOUČASNÉHO PODÁVÁNÍ INHIBITORU BATIMASTAT

Byly použity čtyři skupiny dospělého laboratorního potkana WISTAR (Anlab, ČR).

- a) Dvě skupiny byly vystaveny hypoxickým podmínkám (10% O_2) v isobarické komoře po dobu 3 týdnů (Obrázek 10), tak jak je to popsáno v experimentu se 4denní hypoxií. Jedné hypoxické skupině ($n=12$) byl aplikován intraperitonálně batimastat (British Biotech, Velká Británie) v dávce 30 mg/kg/den, druhé hypoxické skupině ($n=12$) bylo po stejnou dobu aplikováno pouze rozpouštědlo (fosfátový pufr a 0,01% Tween 80).
- b) Další dvě skupiny laboratorních potkanů byly chovány v normálních atmosférických podmínkách.

Jedné hypoxické skupině ($n=12$) byl aplikován intraperitonálně batimastat (British Biotech, Velká Británie) v dávce 30 mg/kg/den, druhé hypoxické skupině ($n=12$) bylo po stejnou dobu aplikováno pouze rozpouštědlo (fosfátový pufr a 0,01% Tween 80).



Obrázek 10: Schéma izobarické hypoxické komory. A-vlastní uzavíratelná komora pro umístění experimentálních zvířat, B-čerpadlo pro cirkulaci plynů, C-mrazicí zařízení pro kondenzaci vodní páry, D-kolona se sorbentem pro záchyt respirovaného CO_2 , E-regulační obvod s čidly pro měření O_2 a CO_2 , N_2 – tlaková láhev s dusíkem pro izobarickou úpravu koncentrace O_2 .

Zvířata byla usmrcena do 12 hodin po ukončení expozice hypoxií (hyperkapnií). V anestézii (pentobarbital sodný, 50 mg/kg) jim byl otevřen hrudní koš, přestřižena aorta a rychle vyjmuto srdce, poté exsanguinací eutanizována. Aorta a pulmonální artérie byly ze srdce opatrně odstraněny u povrchu komor, pravá a levá komora srdeční byly od sebe odděleny, vysušeny, zváženy, zmrazeny v tekutém dusíku a do další analýzy uchovány při -70° C.

3.1.3 DLOUHODOBÁ APLIKACE METAMFETAMINU LABORATORNÍMU POTKANŮVI

Byly použity 2 skupiny dospělého laboratorního potkana WISTAR (Anlab, ČR).

1. První skupině (n=24) po sedmidenní aklimatizaci s volným přístupem k vodě a standardní peletové potravě byl aplikován S-(+/-)-metamfetaminhydrochlorid (Farmaceutická fakulta UK, ČR) do podkoží, rozpuštěný v izotonickém fyziologickém roztoku (1mg/l) v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 8 týdnů.
2. Druhé skupině (n=16) po sedmidenní aklimatizaci s volným přístupem k vodě a standardní peletové potravě byl aplikován do podkoží pouze isotonický fyziologický roztok (ekvivalentní objemové množství bez metamfetaminu) 9 týdnů.

Zvířata byla usmrcena do 12 hodin po aplikaci poslední dávky. V anestézii (pentobarbital sodný, 50 mg/kg) jim byl otevřen hrudní koš, přestřižena aorta a rychle vyjmuto srdce, poté exsanguinací eutanizována. Zároveň byla zachycena krev (do zkumavek se separačním gelem) pro další analýzy, odstředěna při 4 000 g 10 minut a sérum odděleno, do další analýzy zamrazeno na -70° C. Aorta a pulmonální artérie byly ze srdce opatrně odstraněny u povrchu komor, pravá a levá komora srdeční byly od sebe odděleny, vysušeny, zváženy, zmrazeny v tekutém dusíku a do další analýzy uchovány při -70° C.

3.2. SOUBORY PACIENTŮ

3.2.1 SOUBOR PACIENTŮ S PORUCHOU LIPIDOVÉHO METABOLIZMU

Základní soubor byl tvořen 40 jedinci (20 mužů, věkový průměr 41 let \pm 15; 20 žen, věkový průměr 62 \pm 23), u kterých byla laboratorním vyšetřením prokázána nerovnováha základních biochemických parametrů lipidového spektra (celkový cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol a triacylglyceroly). Po třech měsících léčby v lipidové ambulanci Ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol byl pacientům odebrán vzorek krve a byla opět provedena všechna výše uvedená vyšetření. 20 pacientů bylo léčeno hypolipidemiky. Pacienti užívali statiny, fibráty nebo kombinace těchto léků (Simvacard-Zentiva, ČR; simvastatinum v dávce 20 mg/den nebo Lipirex S-Winthrop, Francie; fenofibratum v dávce 160 mg/den). 20 pacientů dodržovalo pouze režimová opatření a dietu. Kontrolní soubor tvořily osoby (20 mužů a 20 žen) bez jakýchkoliv abnormalit v lipidovém spektru.

3.2.2 SOUBOR PACIENTŮ S TRAUMATICKÝM POŠKOZENÍM MOZKU

Pacienti s traumatickým poškozením mozku (n=20) byli rozděleni do 2 skupin podle klinických kritérií – tzv. *Glasgow Coma Scale* (GCS) škály, která je běžně používána v klinické praxi pro určení stupně bezvědomí pacienta. Skupina I (n=9) zahrnovala pacienty, u nichž se během 8denní hospitalizace zlepšilo GCS skóre na hodnotu 15 bodů. Skupina II (n=11) zahrnovala pacienty, u nichž ke zlepšení nedošlo. U 4 z nich bylo diagnostikováno axonální poškození. Vzorky krve byly od pacientů získány v rámci běžných rutinních diagnostických procesů. Tato studie byla schválena etickou komisí institucí, z nichž vzorky pocházely (FN Motol a FN Královské Vinohrady).

3.3. LABORATORNÍ METODY

3.3.1 IZOLACE PROTEINŮ ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ – PROTEINOVÁ PROFILACE

Izolace proteinů ze srdeční tkáně byla provedena v modifikaci dle Peloucha a kol. (Pelouch et al., 1995). Vzorky srdeční tkáně z levé nebo pravé komory (přibližně 50 mg) byly homogenizovány v 20násobku objemu pufru A (0,05 mol.l⁻¹ fosfátového pufru, 0,01 mol.l⁻¹ EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,4). Vzorky byly extrahovány za stálého třepání 24 hodin při teplotě 4°C, poté byly centrifugovány 10 min. při 10 000 g. Supernatant byl oddělen (obsahoval frakci tzv. metabolických proteinů – enzymy glykolytických a aerobních metabolických cest) a peleta byla znovu rozpuštěna v 10násobku objemu pufru B (0,9 mol.l⁻¹ NaCl, 0,05 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5) a extrahována za stálého třepání 24 hodin při teplotě 4°C, pak centrifugována 15 min. při 10 000 g. Supernatant byl oddělen (obsahuje především kontraktilní proteiny), peleta byla promyta roztokem kyseliny octové (0,5 mol.l⁻¹) a pak vystavena pepsinové digesci (24 hodin při teplotě 4°C použitím 10 mg pepsinu.g⁻¹ vlhké tkáně v 0,5 mol.l⁻¹ kyselině octové). Vzorky byly poté centrifugovány (při 14 000 g 15 minut). Jak peleta, tak supernatant (obsahující pepsinem rozpustné složky extracelulární matrix) byly uchovány. Extrakce s pepsinem byla zopakována za stejných podmínek a získaný supernatant byl přidán k prvnímu. Peleta byla rozpuštěna v horkém (přibližně 90°C) 1,1 mol.l⁻¹ NaOH 15 minut (získaná frakce obsahovala nerozpustné složky ECM).

3.3.2 STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE BÍLKOVINY VE FRAKČÍCH

Po proteinové profilaci byla koncentrace celkové bílkoviny v jednotlivých frakcích určena Lowryho metodou (Lowry et al., 1951). Pro větší citlivost byla zvolena vlnová délka 750 nm. Hodnoty byly vyjádřeny v mg.g⁻¹ na vlhkou hmotnost tkáně.

3.3.3 STANOVENÍ CELKOVÉHO 4-HYDROXYPROLINU VE TKÁNI

Přibližně 50 µg srdeční tkáně se přesně zvážílo a nechalo vysušit 24 hodin při teplotě do 80°C. Vysušená tkáň se znovu zvážíla a ve skleněných zkumavkách se nechala hydrolyzovat v 1 ml 6 N HCl po dobu 3 hodin při teplotě 130 °C. Zbytek HCl se nechal odpařit, po ochlazení se ke všem vzorkům znovu přidal 1 ml 6 N HCl a aktivní uhlí (na špičku špachtle) a směs se řádně protřepala (na třepačce 10 minut). K usazení aktivního uhlí se vzorky centrifugovaly 20 minut při 10 000 g. K další analýze se použil supernatant a postupovalo se stejně jako ve frakci, viz kapitola 3.3.4.

3.3.4 STANOVENÍ KONCENTRACE 4-HYDROXYPROLINU VE FRAKCI PROTEINŮ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Stanovení 4-hydroxyprolinu (HYP) v extraktech ze srdeční tkáně byla provedeno následovně. 50 µl extraktu bylo odebráno do skleněné zkumavky a vysušeno přes noc při teplotě 80 °C v sušárně. Poté bylo přidáno 50 µl 4 N NaOH a směs byla temperována 10 minut při teplotě 120 °C, pak následovala neutralizace 50 µl 1,4 N kyselinou citrónovou. Po neutralizaci se okamžitě přidal 1 ml roztoku chloraminu T (1,41 g chloraminu T bylo rozpuštěno v 10 ml n-propanolu, 10 ml destilované vody a 80 ml citrát-acetátového pufru). Směs byla protřepána a inkubována při laboratorní teplotě 20 minut. Poté byl přidán 1 ml roztoku PDAB (15 g p-dimethylaminobenzaldehydu se rozpustilo v 62 ml n-propanolu a 26 ml 60 % HClO₄) a směs byla inkubována 15 minut při 65 °C za současného třepání. Byla měřena absorbance vzniklého barevného produktu při 550 nm. Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit standard L-4-hydroxyprolinu (Sigma Aldrich), 10 mg látky bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody, sestrojena kalibrační řada o koncentracích 0 - 0,5 - 1 - 2,5 - 5 -10 µg napipetováním příslušného objemu zásobního roztoku a po vysušení se postupovalo stejně jako s extraktem (Pelouch et al., 1993b).

3.3.5 ELEKTROFORÉZA KOLAGENNÍCH PROTEINŮ

Po provedené frakcionaci byla elektroforéza kolagenních proteinů z rozpustné frakce ECM provedena v polyakrylamidovém gelu dle systému Laemli v přítomnosti SDS (Pelouch et al., 1995). K separaci kolagenních proteinů byl použit gel

o koncentraci 7,5 %, zapouštěcí gel měl koncentraci 4 %. Elektroforetické dělení bylo provedeno za konstantního napětí 150 V po dobu 50 minut. Gely byly obarveny v 0,3% roztoku Coomassie Brilliant Blue⁵. Odbarvování bylo provedeno pomocí odbarvovacího roztoku⁶. Po přidání několika kapek glycerolu se gel ještě asi 15 minut odbarvoval. Odbarvený gel byl vysušen mezi celofánovými foliemi předtím namočenými do odbarvovacího roztoku s glycerolem. Identifikace separovaných proteinů byla provedena pomocí použitých molekulových standardů, které byly separovány spolu s analyzovanými extrakty. Gely byly naskenovány a pro semikvantitativní stanovení kolagenních proteinů byl použit software analýzy obrazu (ElfoMan 2.0, Semecký; ČR).

3.3.6 EXTRAKCE CELKOVÉ RNA ZE SRDEČNÍ TKÁNĚ

Celková RNA byla izolována ze tkání srdečních komor rutinní metodou s chloridem cesným (Chirgwin et al., 1979). Zamražené vzorky tkání (přibližně 100 mg) byly rychle zhomogenizovány, k homogenátu byl přidán roztok s CsCl a po ultracentrifugaci byla peleta obsahující RNA rozpuštěna v TE pufru. Koncentrace RNA byla vypočítána měřením absorbance při 260 nm.

3.3.7 ELEKTROFORÉZA, NORTHERNBLOT A HYBRIDIZACE MRNA

Vzorky RNA (20 µg) byly nanесeny na 1% agarózový/formaldehydový gel, elektroforeticky rozděleny a přeneseny na nitrocelulózuovou membránu (HYBOND-N RPN.203 N, Amersham Pharmacia, VB). Membrány byly sušeny při 80 °C 2 hodiny. Pro hybridizaci byly použity komplementární próby DNA (cDNA) myšího prokolagenu α_1 (I) a potkanního prokolagenu α (III) (obdrženo od dr. Takaly, Univerzita v Jyväskylä, Finsko), potkanního TIMP 1 a MMP-2 (dar dr. Eklunda z Univerzity Oulu, Finsko), potkanní ANP a 18 S RNA (482-bp cDNA próba) (Magga et al., 1997). cDNA byla vždy označena pomocí [α -³²P]dCTP komerčním značkovacím setem REDIPRIMETMII (Amersham Pharmacia, VB). Prehybridizace filtrů byla provedena ultrasenzitivním hybridizačním roztokem (ULTRAhybTM, Ambion, USA) po dobu 30 minut při 42 °C. Samotná hybridizace probíhala 24 hodin při teplotě 42-52°C s použitím stejného pufru jako pro prehybridizaci. Po

⁵ rozpuštěno ve směsi methanol-kyselina octová-voda (4:1:5) (V/V/V)

⁶ methanol:kyselina octová:voda 4:1:5 (V/V/V)

hybridizaci byly membrány promyty dvakrát v 0,1% x SSC + 0,1% SDS při 60 °C 20 minut a uloženy k expozici do fosforeskujících desek. Výsledky autoradiogramů po expozici byly kvantifikovány denzitometricky (Bio-Rad zobrazující denzitometr GS 670). Signály specifických mRNA byly normalizovány 18S rRNA pro korekci rozdílných nanesení a přenosů mRNA během analýzy (Eklund et al., 2001, Kukacka et al., 2002).

3.3.8 ZYMOGRAFIE MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ

Pro kvalitativní určení a semikvantitativní zhodnocení aktivity matrixových metaloproteináz v extraktu ze srdeční tkáně nebo ze séra byla použita elektroforetická technika zymografie, která je modifikací standardní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). K polyakrylamidovému gelu se před polymerací přidala želatina (Sigma Aldrich, USA) v koncentraci 1 g/l (Tyagi et al., 1993a).

Srdeční tkáň (20 mg) byla dezintegrována na malé kousky a za stálého míchání po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C extrahována v 10násobném množství pufru, který obsahoval 10 mmol.l⁻¹ kyseliny kakodylové (Sigma Aldrich, USA), 150 mmol.l⁻¹ NaCl, 1 μmol.l⁻¹ ZnCl₂, 20 mmol.l⁻¹ CaCl₂, 3,0 mmol.l⁻¹ NaN₃ a 0,01% Triton X-100. MMP ze séra byly extrahovány obdobně jako ze tkáně. K 15 μl séra bylo přidáno 100 μl kakodylátového extrakčního pufru. Další postup byl pro tkáň a sérum jednotný. Po skončení extrakce byly extrakty centrifugovány po dobu 30 minut při 10000 g. U všech vzorků byla změřena koncentrace celkové bílkoviny (Lowryho metodou). Extrakt byl před elektroforézou naředěn na jednotnou nejnižší koncentraci.

Před elektroforetickým dělením byl každý vzorek smíchán s Laemmli SDS vzorkovým pufrům bez přítomnosti redukujících látek a nanesen na 8% polyakrylamidový gel. Samotné dělení probíhalo 45 minut při napětí 150 V a pokojové teplotě. Po skončení dělení byly gely promyty dvakrát 20 minut v 2,5% roztoku Triton X-100 pro odstranění SDS a renaturování enzymů. Poté byly gely inkubovány v substrátovém pufru (50 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,8; 10 mmol.l⁻¹ NaCl; 10 mmol.l⁻¹ CaCl₂) 14 hodin při 37 °C. Gely byly obarveny v 0,3% Coomassie Brilliant Blue⁷. Odbarvování bylo provedeno pomocí odbarvovacího roztoku⁸ do objevení ostré a výrazné lytické zóny. Po přidání několika kapek glycerolu se gel ještě asi 15 minut odbarvoval. Odbarvený gel byl vysušen mezi

⁷ rozpuštěno ve směsi methanol-kyselina octová-voda (4:1:5) (V/V/V)

⁸ methanol: kyselina octová: voda 4:1:5 (V/V/V)

celofánovými foliemi předtím namočenými do odbarvovacího roztoku s glycerolem (Vajtr et al., 2002, Kotaska et al., 2006).

3.3.9 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ MMP-3

Ke stanovení byl použit diagnostický kit Matrix Metalloproteinase-3 Biotrak Activity Assay System (GE Healthcare, USA).

Součásti kitu:

1. mikrodestička – 12x8
2. pufr (TRIS-HCl)
3. protilátka proti MMP-3 (lyofilizovaná myší anti-MMP3)
4. standard – 32 ng lyofilizované MMP-3
5. APMA -352 mg v práškové formě
6. detekční enzym (urokináza)
7. substrát (peptid S-2444TM)
8. promývací pufr (fosfátový pufr, pH 7,0)

Princip stanovení MMP-3 se zakládá na využití detekce aktivity zymogenu, který je po záchytu protilátkou nejdříve převeden v aktivní formu. Takto aktivovaný enzym může být měřen pomocí specifického chromogenního peptidového substrátu. Protilátka anti-MMP-3 (lyofilizovaná myší monoklonální protilátka) byla první den imobilizována v mikrotitrační destičce. Následovala 3hodinová inkubace při 37 °C, odsátí a promytí. Přidal se standard a vzorky; vzniklý komplex [anti-MMP-3-MMP-3] se nechal přes noc inkubovat. Veškerá přítomná MMP-3 se navázala do jamek, ostatní komponenty ve vzorku byly pak odstraněny odsátím a promytím. Celková aktivita MMP byla změřena po přidání APMA. Detekční reagentie (směs detekčního enzymu a chromogenního substrátu) vyvolala barevnou reakci. Měření se provádělo při vlnové délce 405 nm v čase $t = 0$ a po 6,5hodinové inkubaci. Koncentrace byla stanovena interpolací z kalibrační křivky dle vztahu $(A_{t=6,5} - A_{t=0} * 1000)/6,5^2$. Citlivost reakce byla 0,1 µg/l.

3.3.10 KVANITATIVNÍ STANOVENÍ MMP-9

Ke stanovení byl použit diagnostický kit Matrix Metalloproteinase-9 Biotrak Activity Assay System (GE Healthcare, USA).

Součástí kitu:

1. mikrodestička – 12x8 potažená protilátkou proti MMP-9, připraveno k použití
2. pufr (TRIS-HCl)
3. standard – 32 ng lyofilizované MMP-9
4. APMA -352 mg v práškové formě
5. detekční enzym (urokináza)
6. substrát (peptid S-2444TM)
7. promývací pufr (fosfátový pufr, pH 7,0)

Do jamek mikrotitrační destičky jamek s navázanou protilátkou anti-MMP-9 (lyofilizovaná lidská monoklonální protilátka) se přidaly standardy a vzorky. Vznikající komplex [anti-MMP-9-MMP-9] se nechal přes noc inkubovat. Veškerá přítomná MMP-9 se navázala do jamek, ostatní komponenty ve vzorku byly odstraněny odsátím a promytím. Přidal se APMA. Po 90 minutách inkubace při 37 °C následovalo odsátí a promytí. Po přidání detekční reagensie se změnila zbarvení při vlnové délce 405 nm v čase $t = 0$ a po jednohodinové inkubaci. Koncentrace byla stanovena interpolací z kalibrační křivky dle vztahu $(A_{t=1} - A_{t=0} * 1000)/1^2$. Citlivost metody byla 0,5 µg/l.

3.3.11 KVANITATIVNÍ STANOVENÍ MMP-2

Ke stanovení byl použit diagnostický kit Matrix Metalloproteinase-2 Biotrak Activity Assay System (GE Healthcare, USA).

Součástí kitu:

- 1 mikrodestička – 12x8 potažená protilátkou proti MMP-2, připraveno k použití
2. pufr (TRIS-HCl)

3. standard – 24 ng lyofilizované MMP-2
4. APMA -352 mg v práškové formě
5. detekční enzym (urokináza)
6. substrát (peptid S-2444 TM)
7. promývací pufr (fosfátový pufr, pH 7,0)

Do jamek mikrotitrační destičky jamek s navázanou protilátkou anti-MMP-2 (lyofilizovaná lidská monoklonální protilátka) se přidaly standardy a vzorky (ředěné 100x) Vznikající komplex [anti-MMP-2-MMP-2] se nechal přes noc inkubovat. Veškerá přítomná MMP-2 se navázala do jamek, ostatní komponenty ve vzorku byly odstraněny odsátím a promytím. Přidal se APMA. Po 120 minutách inkubace při 37 °C následovalo odsátí a promytí. Po přidání detekční reagensie se změnila změna zbarvení při vlnové délce 405 nm v čase $t = 0$ a po 3hodinové inkubaci. Koncentrace byla stanovena interpolací z kalibrační křivky dle vztahu $(A_{t=3} - A_{t=0} * 1000)/3^2$. Citlivost metody byla 0,5 µg/l.

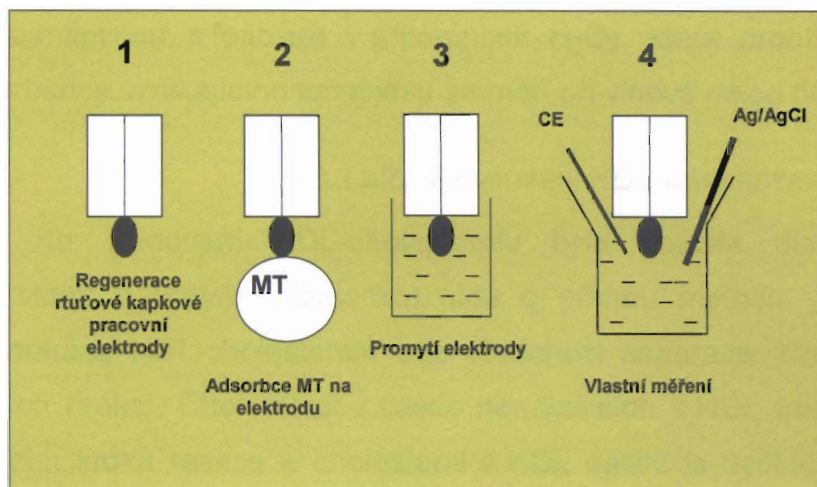
3.3.12 ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ METALOTHIONEINU

Elektrochemické měření bylo provedeno na analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s třielektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)⁹ s povrchem kapky 0,4 mm². Jako referenční elektroda byla použita Ag/AgCl/3mol.l⁻¹ KCl elektroda a jako pomocná elektroda grafitová elektroda. Jako podpůrný elektrolyt byla použita směs pufrů (Obrázek 11). Pro vyrovnání a korekci základní osy byl použit software GPES 4.4 (EcoChemie, ČR). Stanovení MT v séru bylo provedeno optimalizovanou adsorptivní přenosovou rozpouštěcí technikou (AdTS¹⁰) diferenční pulzní voltametrie (DPV) s Brdičkovou reakcí (Petrlova et al., 2005, Kukacka et al., 2006a, Petrlova et al., 2006). Množství analyzovaného materiálu bylo 5 µl. Brdičkův podpůrný elektrolyt obsahoval 1 mmol.l⁻¹ Co(NH₃)₆Cl₃ a analýza byla provedena v amonném pufru o koncentraci 1 mol.l⁻¹ (NH₃ (aq) + NH₄Cl, pH=9,6). Povrchově aktivní látky nebyly použity. Parametry AdTS DPV Brdičkovy reakce byly následující: počáteční napětí -0,6 V, koncové napětí -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, krokové napětí 1,05 mV/s, modulační

⁹ hanging mercury drop electrode

¹⁰ adsorptive transfer stripping

amplituda 250 mV, $E_{ads}=0$ V. Stálá teplota podpůrného elektrolytu byla udržována pomocí průtokových elektrochemických cel spojených s termostatem (JULABO F12/ED; Německo).



Obrázek 11: Princip diferenční pulzní voltametrie s adsorptivní přenosovou technikou. 1 – obnovení visící rtuťové kapkové elektrody, 2- adsorbce analytu na elektrodu, 3-promytí elektrody, 4-vlastní měření s pomocí referenční elektrody a měrné elektrody Brdičkovou reakcí.

3.3.13 STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ LIPIDOVÉHO SPEKTRA

Koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a triacylglycerolů byly měřeny na biochemickém analyzátoru Advia 1650 (Bayer, USA), který je samostatnou jednotkou umožňující dávkování vzorků i reagensů, inkubaci, detekci i automatické vyhodnocení výsledků.

3.3.13.1. STANOVENÍ CELKOVÉHO CHOLESTEROLU

Ke stanovení celkového cholesterolu byla použita diagnostická souprava Cholesterol (Bayer, SRN). Estery cholesterolu jsou hydrolyzovány cholesterolesterázou na cholesterol a volné mastné kyseliny. Cholesterol je pak oxidován v přítomnosti kyslíku na cholesten-3-on za uvolnění H_2O_2 . Poslední fází stanovení je oxidační kopulace 4-aminoantipyrinu s fenolem v přítomnosti H_2O_2 , která probíhá za katalýzy peroxidázy. Absorbance vznikajícího komplexu se měří při vlnové délce 505 nm (Allain et al., 1974).

3.3.13.2. STANOVENÍ HDL-CHOLESTEROLU

Ke stanovení HDL-cholesterolu byla použita diagnostická souprava HDL-cholesterol II (Bayer, Německo). Jde o přímou metodu, jejímž principem je měření koncentrace HDL-cholesterolu bez předchozí separace. Stanovení se skládá ze dvou různých reakcí. Cholesterol z částic nenáležících k HDL frakci je uvolněn a eliminován v prvním kroku reakce a cholesterol z HDL částic je uvolněn ve druhém kroku pomocí detergentu obsaženém v činidlo R2. Výsledná koncentrace je stanovena reakcí dle Trinderova. Intenzita zbarvení v reakci podle Trinderova je úměrná koncentraci HDL cholesterolu. Absorbance se měří při 596 nm (2002).

3.3.13.3. STANOVENÍ LDL-CHOLESTEROLU

Ke stanovení LDL-cholesterolu byla použita diagnostická souprava LDL-cholesterol (Bayer, Německo). V prvním kroku reakce je cholesterol eliminován pomocí speciálního detergentu ze všech frakcí kromě LDL frakce. H_2O_2 z první reakce reaguje s katalázou, ve druhé reakci je jiným detergentem uvolněn cholesterol z LDL částic. Kataláza je inhibována azidem sodným. Výsledná koncentrace je stanovena reakcí dle Trinderova. Měření se provádí při 596 nm (Okada M, 1998).

3.3.13.4. STANOVENÍ TRIACYLGLYCEROLŮ

Ke stanovení triacylglycerolů byla stejně jako v předchozích případech použita diagnostická souprava od firmy Bayer (Německo). TG jsou v první reakci s lipázou hydrolyzovány na glycerol a volné mastné kyseliny. Ve druhé reakci je glycerol fosforylován ATP působením glycerolkinázy na glycerol-3-fosfát. Ve třetí reakci je glycerol-3-fosfát oxidován na dihydroxyacetonfosfát glycerolfosfát oxidázou za vzniku H_2O_2 . V poslední reakci vzniká kopulační reakcí 4-aminoantipyrinu s 4-chlorfenolem

v přítomnosti H_2O_2 barevný komplex. Kopulační reakce probíhá v přítomnosti peroxidázy. Absorbance vznikajícího barevného komplexu se měří při 505 nm (Fossati P, 1982).

3.4. STATISTICKÉ METODY

Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu StatView a GraphPad Prism 4.0 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, popřípadě $\alpha = 0,01$ nebo $\alpha = 0,001$. Normální rozložení dat u jednotlivých souborů bylo ověřeno Kolmogorovovým-Smirnovovým testem. V případě normálního rozložení dat byly pro další analýzu použity parametrické testy (Studentův t-test nebo ANOVA). Pro neparametrická rozložení bylo použito neparametrického t-testu (Mann-Whitney U test nebo neparametrická analýza rozptylu). Všechna prezentovaná data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm standardní chyba měření (SEM). U neparametrického rozložení dat byla provedena logaritmická transformace hodnot.

4. VÝSLEDKY

4.1. EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 4DENNÍ HYPOXII A 4DENNÍ HYPOXII S HYPERKAPNÍÍ

4.1.1 VLIV 4DENNÍ HYPOXIE A HYPOXIE S HYPERKAPNÍÍ NA TĚLESNOU HMOTNOST A HMOTNOST SRDCE

4denní hypoxie způsobila pokles tělesné hmotnosti laboratorního potkana u obou skupin (Tabulka 8). U skupiny hypoxické (H) to bylo o -9,2 %, u skupiny hypoxicko-hyperkapnické (HC) o -14,6 %. Absolutní hmotnost srdce se nezměnila u žádné skupiny, ale relativní hmotnost srdce se zvýšila jak u skupiny H tak HC. U skupiny H to bylo zapříčiněno především zvětšením pravé komory srdeční, u skupiny HC zvětšením pravé i levé komory. Poměr pravé a levé komory (RV/LV) byl zvýšen u obou skupin oproti kontrolám.

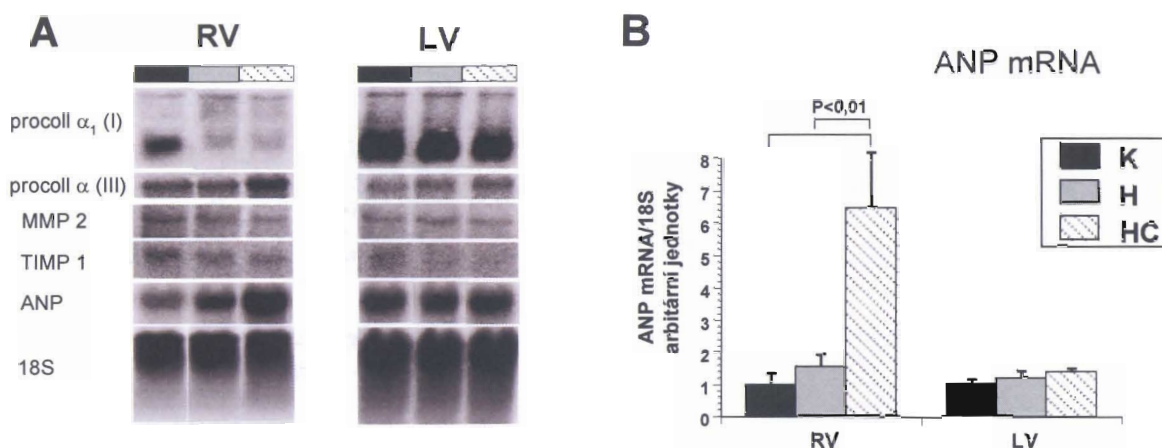
Tabulka 8. Vliv 4denní chronické hypoxie a hyperkapnie na tělesnou hmotnost a hmotnostní parametry srdce

hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, K - kontroly, H – hypoxie-hypokapnie, HC – hypoxie-hyperkapnie.

BW - tělesná hmotnost, HW – absolutní hmotnost srdce, RV - hmotnost pravé komory srdce, LV - hmotnost levé komory srdce (bez septa), HW/BW – relativní HW, RV/BW - relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory. Hladiny statistické významnosti: ^Ap<0,05 rozdílné od kontrol; ^Bp<0,05 rozdílné od hypoxické skupiny; ANOVA.

skupina	počet	BW	HW	RV	LV
	n	g	mg	mg	mg
K	12	267,50 ± 0,93	749 ± 18	167 ± 14	410 ± 20
H	12	242,83 ± 3,26 ^A	755 ± 16	178 ± 6	377 ± 10
HC	12	228,50 ± 3,68 ^{AB}	784 ± 27	194 ± 7 ^A	405 ± 20

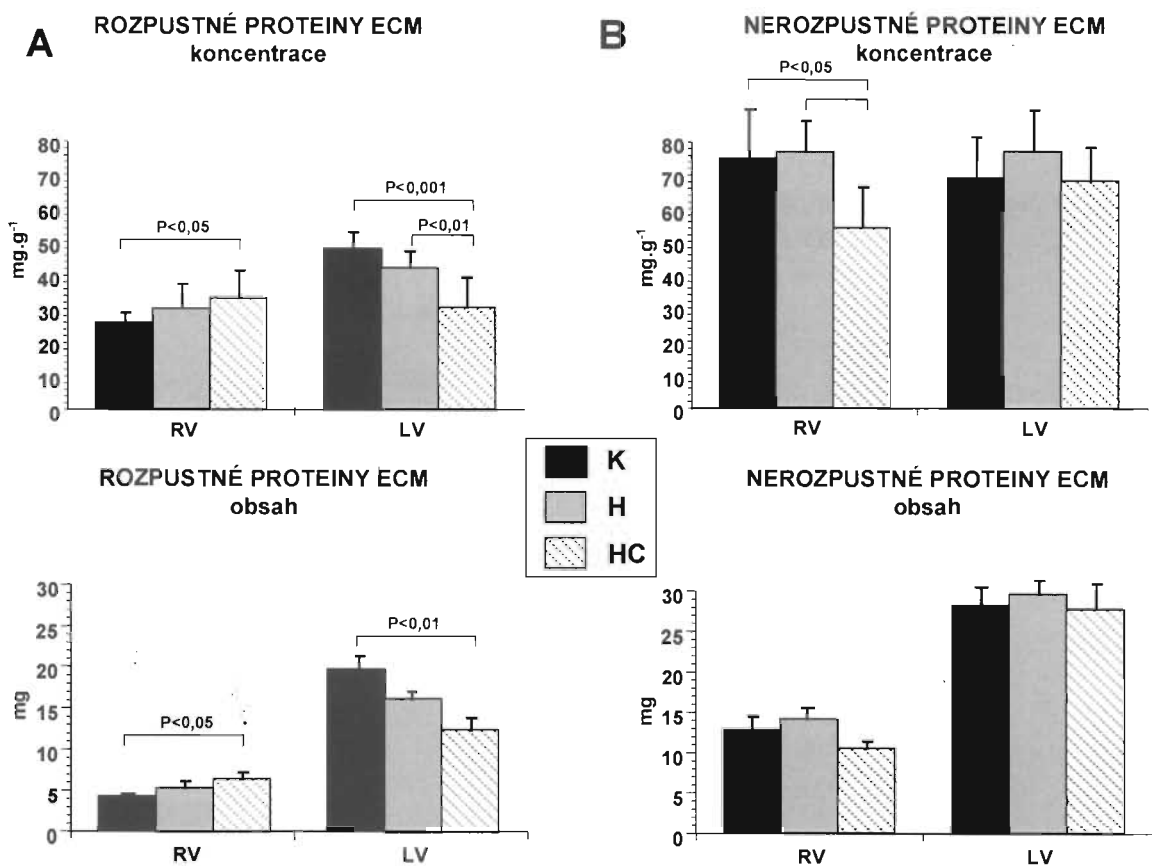
skupina	počet	HW/BW	RV/BW	LV/BW	RV/LV
	n	mg.g ⁻¹	mg.g ⁻¹	mg.g ⁻¹	
K	12	2,80 ± 0,06	0,59 ± 0,03	1,50 ± 0,04	0,40 ± 0,03
H	12	3,12 ± 0,09 ^A	0,74 ± 0,02 ^A	1,54 ± 0,05	0,49 ± 0,02 ^A
HC	12	3,43 ± 0,10 ^{AB}	0,85 ± 0,04 ^{AB}	1,77 ± 0,06 ^{AB}	0,48 ± 0,02 ^A



Graf 1: Reprezentativní autoradiogram z Northern blot analýzy (A) a množství mRNA ANP v hypoxické a hypoxicko-hyperkapnické srdeční tkáni (B). RNA byla izolována ze srdeční tkáně. Elektroforetické rozdělení, transfer RNA a promývací procedury jsou popsány v oddílu o metodikách. Graf je výsledkem denzitometrického skenování autoradiogramů. Stejný blot byl hybridizován s próbami pro prokolagen α_1 (I), prokolagen α (III), MMP 2, TIMP 1, ANP a 18S rRNA. Stejně nanesení RNA je prokázáno shodnou expresí 18 S rRNA. K=kontrolní skupina, H=hypoxická skupina, HC=hypoxicko-hyperkapnická skupina.

4.1.2 PROTEINOVÁ SKLADBA PRAVÉ A LEVÉ KOMORY SRDCE: KONCENTRACE A OBSAH PROTEINŮ

Koncentrace proteinů extracelulární matrix (ECM) nebyla ovlivněna v pravé komoře hypoxických zvířat, na druhé straně vyšší koncentrace rozpustných kolagenních proteinů byla nalezena v pravé komoře hypoxicko-hyperkapnických zvířat. U hypoxicko-hyperkapnické skupiny poklesla koncentrace nerozpustných kolagenních proteinů, zároveň u této skupiny byl zjištěn pokles koncentrace kolagenních proteinů v levé komoře (Graf 2).

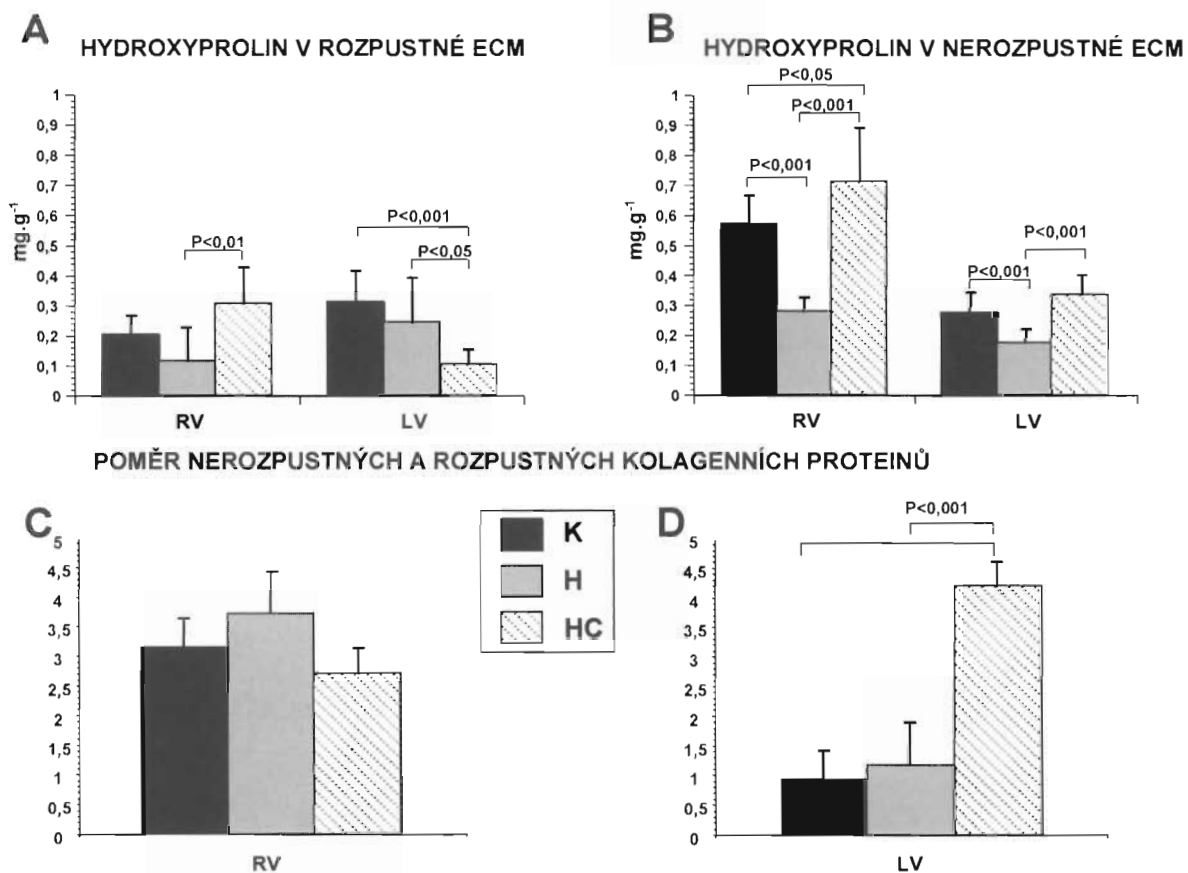


Graf 2: Koncentrace a obsah rozpustných proteinů extracelulární matrix (A) a nerozpustných proteinů extracelulární matrix (B). Koncentrace je vyjádřena v mg.g⁻¹ vlhké hmotnosti srdeční tkáně, obsah v mg. Hodnoty jsou průměr ± SEM. K=kontrolní skupina, H=hypoxická skupina, HC=hypoxicko-hyperkapnická skupina.

4.1.3 SRDEČNÍ KOLAGEN – KONCENTRACE, ROZPUSTNOST A GENOVÁ EXPRESE

Koncentrace hydroxyprolinu v pravé a levé komoře potkanů vystavených hypoxickým nebo hypoxicko-hyperkapnickým podmínkám se lišila od koncentrace v komorách kontrolních potkanů. Rozdíly byly způsobeny vyšší koncentrací hydroxyprolinu ve frakci nerozpustných proteinů. Hypoxie způsobila pokles koncentrace hydroxyprolinu ve frakci nerozpustných proteinů ECM v pravé i levé komoře. Naopak hypoxie-hyperkapnie zvýšila koncentraci hydroxyprolinu ve frakci jak rozpustných, tak nerozpustných proteinů ECM pravé komory, v LV to bylo jen ve frakci nerozpustných proteinů ECM (Graf 3 A, B). Poměr nerozpustného a rozpustného srdečního kolagenu se

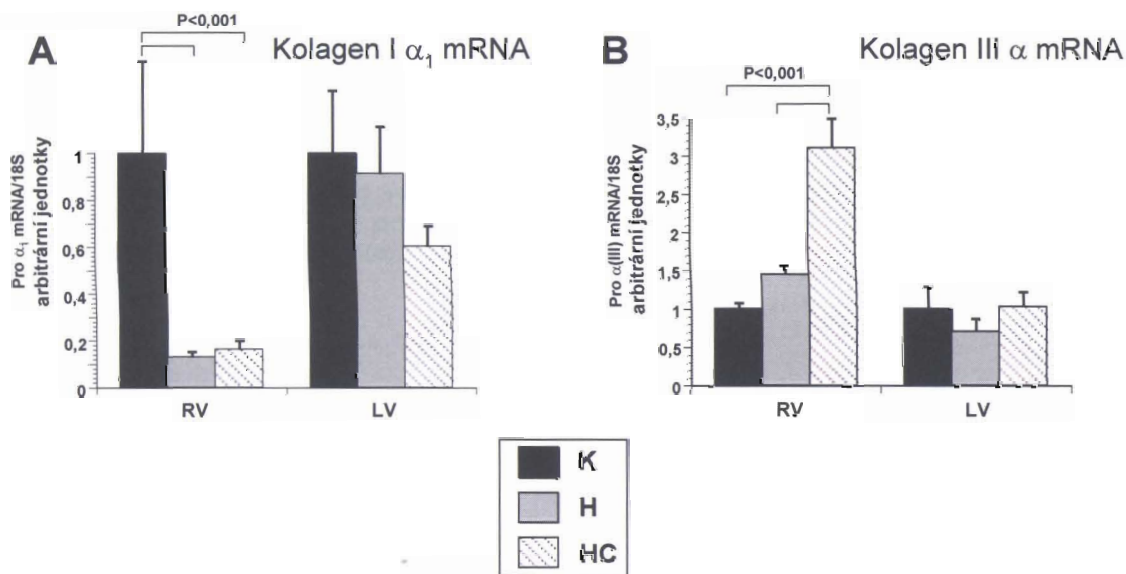
lišil u kontrol a pokusných zvířat, tento poměr byl vyšší v levé komoře HC skupiny (Graf 3 C, D). Množství mRNA pro prokolagen α_1 (I) poklesla v RV u H i HC skupiny, žádné změny nebyly pozorovány v LV. Množství mRNA pro prokolagen α (III) byla vyšší v pravé komoře pouze hypoxicko-hyperkapnické skupiny zvířat (Graf 4 A, B a Graf 1A).



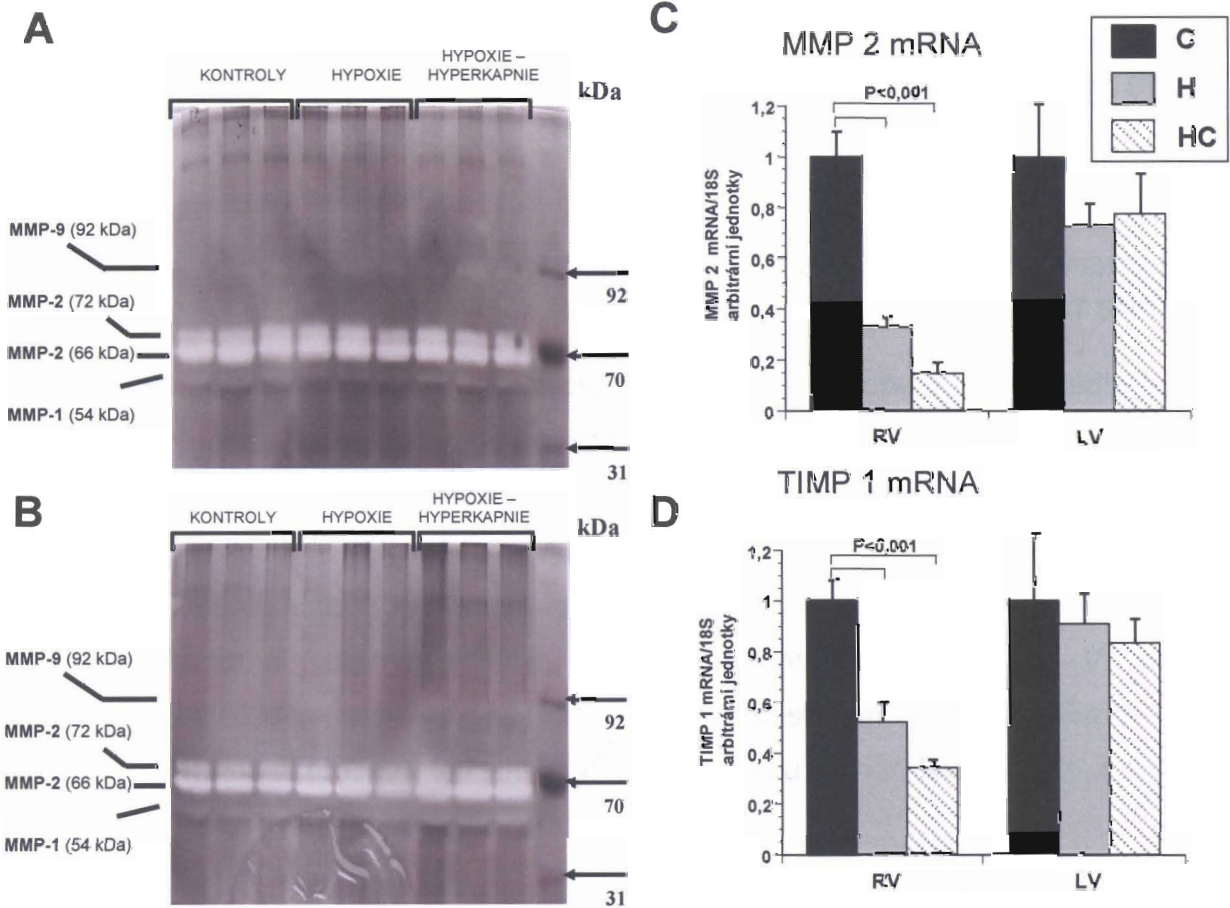
Graf 3: Koncentrace kolagenu ve frakci rozpustných (A) a nerozpustných (B) proteinů ECM. Koncentrace kolagenu byla určena stanovením hydroxyprolinu (mg.g^{-1} vlhké hmotnosti). Poměr rozpustných/nerozpustných srdečních kolagenů v RV (C) a LV (D) byl odvozen od koncentrace hydroxyprolinu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. K=kontrolní skupina, H=hypoxická skupina, HC=hypoxicko-hyperkapnická skupina.

4.1.4 AKTIVITA SRDEČNÍCH MMP, GENOVÁ EXPRESE MMP-2 A TIMP-1

Aktivita MMP-2 byla detekována pomocí zymografie (koncentrace gelu 7,5 %) v podobě 2 lytických zón: 72 kDa (proforma) a 66 kDa (aktivní forma); rozdíly ve velikostech těchto zón nebyly nalezeny. Dále byly přítomny velmi slabé lytické zóny odpovídající MMP-9 (92 kDa) a MMP-1 (53 kDa) (Graf 5 A,B). Hodnoty MMP-2 mRNA byly signifikantně nižší u skupin H i HC v porovnání s kontrolami v pravé komoře, v levé komoře nebyly nalezeny žádné rozdíly (Graf 5 C a Graf 1A). TIMP-1 mRNA byla nižší v RV jak H skupiny tak HC skupiny, v LV se nelišila (Graf 5D a Graf 1A).



Graf 4: .Efekt hypoxie a hypoxie-hyperkapnie na množství prokolagenu α_1 (I) mRNA (A) a prokolagenu α (III) mRNA (B). RNA byla extrahována ze srdeční tkáně. 18S = 18S rRNA K=kontrolní skupina, H=hypoxická skupina, HC=hypoxicko-hyperkapnická skupina.



Graf 5: Reprezentativní zymografický PAGE gel (7,5 %) s lytickými zónami matrixových metaloproteináz ze srdečního extraktu pravé (A) a levé (B) komory a vliv hypoxie a hypoxie-hyperkapnie na MMP-2 mRNA (C) a TIMP-1 mRNA (D). Grafy jsou výsledkem denzitometrie autoradiogramů. K=kontrolní skupina, H=hypoxická skupina, HC=hypoxicko-hyperkapnická skupina.

4.2. EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 3TÝDENNÍ HYPOXII ZA SOUČASNÉHO PODÁVÁNÍ INHIBITORU BATIMASTAT

4.2.1 VLV 3TÝDENNÍ HYPOXIE A HYPOXIE ZA SOUČASNÉHO PODÁVÁNÍ BATIMASTATU NA TĚLESNOU Hmotnost A Hmotnost SRDCE

Expozice laboratorního potkana chronické hypoxii (H) po dobu 3 týdnů vedla k poklesu tělesné hmotnosti. Absolutní hmotnost srdce poklesla, ale relativní hmotnost se zvýšila, zrovna tak jako relativní hmotnost pravé i levé komory, index RV/LV+S se také zvýšil (Tabulka 9). Relativní zvětšení bylo vyšší u pravé komory (o 37 %) než u levé komory (o 15 %). Žádné statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny mezi skupinou kontrolní (K) a skupinou kontrolní (nehypoxickou) léčenou batimastatem (K+B). V porovnání s kontrolami, léčba hypoxických potkanů batimastatem (H+B) způsobila pokles relativních hmotností srdce, a to redukcí hmotností obou komor, RV o -15 %, LV o -15 %.

Tabulka 9: Vliv 3týdenní chronické hypoxie a podávání batimastatu na tělesnou hmotnost a hmotnostní parametry srdce

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, BW - tělesná hmotnost, HW – absolutní hmotnost srdce, RV- hmotnost pravé komory srdce, LV - hmotnost levé komory srdce (bez septa), HW/BW – relativní HW, RV/BW - relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, RV/LV+S – poměr hmotnosti RV ku LV se septem. Hladiny statistické významnosti: ^Ap<0,05 rozdílné od kontrol; ^Bp<0,05 rozdílné od skupiny kontroly + batimastat; ^Cp<0,05 rozdílné od hypoxické skupiny; ANOVA.

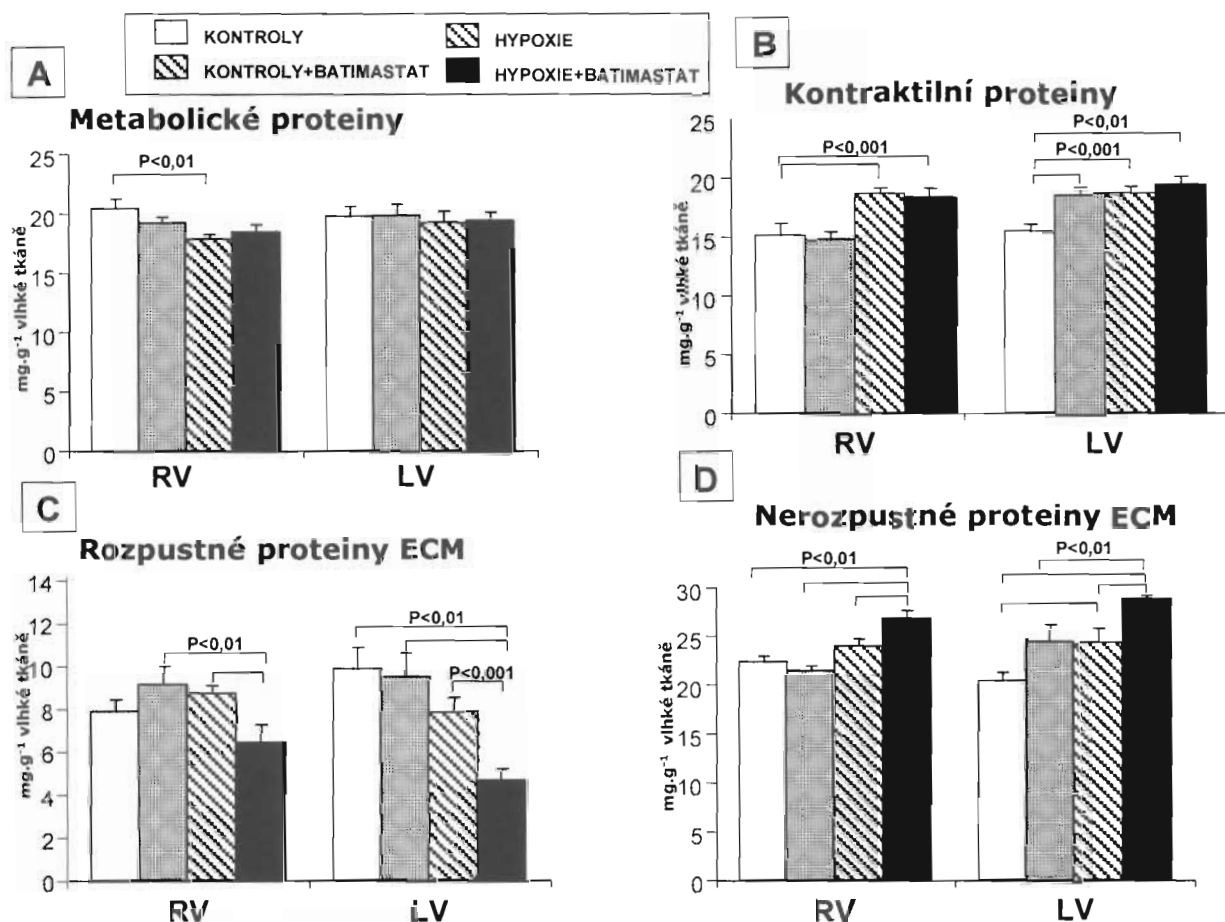
skupina	počet	BW g	HW mg	HW/BW mg.g ⁻¹
Kontroly	12	308,33 \pm 7,51	775 \pm 27	2,52 \pm 0,05
Kontroly + batimastat	12	293,00 \pm 3,86	700 \pm 23	2,39 \pm 0,05
Hypoxické	12	191,00 \pm 4,61 ^{AB}	617 \pm 41 ^{AB}	3,22 \pm 0,17 ^{AB}
Hypoxické + batimastat	12	182,33 \pm 6,08 ^{AB}	532 \pm 14 ^{ABC}	2,92 \pm 0,04 ^{ABC}
		RV/BW mg.g ⁻¹	LV/BW mg.g ⁻¹	RV/LV+S
Kontroly	12	0,62 \pm 0,02	1,36 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01
Kontroly + batimastat	12	0,60 \pm 0,01	1,22 \pm 0,07	0,34 \pm 0,01
Hypoxické	12	0,99 \pm 0,08 ^{AB}	1,60 \pm 0,10 ^{AB}	0,44 \pm 0,03 ^{AB}
Hypoxické + batimastat	12	0,84 \pm 0,04 ^{ABC}	1,78 \pm 0,07 ^C	0,41 \pm 0,03 ^{AB}

4.2.2 PROTEINOVÁ REMODELACE SRDEČNÍHO SVALU

Koncentrace metabolických proteinů byla nižší (o -12,4 %) v RV hypoxických zvířat (17,9 \pm 0,4 mg.g⁻¹ versus 20,4 \pm 0,9 mg.g⁻¹ u kontrol), 19,2 \pm 0,5 mg.g⁻¹ činila koncentrace v RV skupiny kontrolní + batimastat, nižší (n.s.) byla u skupiny hypoxické + batimastat (18,5 \pm 0,7 mg.g⁻¹) (Graf 6A). Na koncentraci metabolických proteinů v LV neměla vliv ani hypoxie ani batimastat (19,8 \pm 0,9 mg.g⁻¹ pro K; 19,9 \pm 1 mg.g⁻¹ pro K+B; 19,2 \pm 1 mg.g⁻¹ pro H; 19,5 \pm 0,7 mg.g⁻¹ pro H+B). Hypoxie významně zvýšila koncentraci kontraktiních

proteinů v obou komorách (z $15,1 \pm 1,1 \text{ mg.g}^{-1}$ na $18,7 \pm 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a z $15,5 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ na $18,7 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV). Podávání batimastatu neovlivnilo koncentraci kontraktilních proteinů v hypoxické skupině ($18,4 \pm 0,8 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $19,4 \pm 0,7 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV), ale koncentrace byla vyšší v LV ($18,7 \pm 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$) u skupiny K+B, v RV se statisticky nelišila ($14,8 \pm 0,7 \text{ mg.g}^{-1}$) (Graf 6B).

Výraznější změny byly pozorovány ve frakcích proteinů ECM (Graf 6C). Koncentrace rozpustných proteinů ECM byla mírně zvýšená v RV ($8,7 \pm 0,4 \text{ mg.g}^{-1}$ oproti $7,9 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ u K) a snižena v LV u hypoxických zvířat ($7,9 \pm 0,7 \text{ mg.g}^{-1}$ oproti $9,8 \pm 1,1 \text{ mg.g}^{-1}$ u K). Ale současné podávání batimastatu v obou komorách vedlo ke snížení koncentrace těchto proteinů ($6,4 \pm 1,2 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $4,9 \pm 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV). Koncentrace u skupiny K+B činila $9,1 \pm 0,9 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $9,5 \pm 1,5 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV. Pokles byl výraznější v levé komoře, kde klesl o 52,3 %. Inhibice matrixových metaloproteináz v hypoxických podmínkách aktivovala zvýšení koncentrace nerozpustných složek ECM v obou komorách ($26,8 \pm 0,9 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV oproti $24,0 \pm 0,8 \text{ mg.g}^{-1}$ u H v RV a $28,8 \pm 0,4 \text{ mg.g}^{-1}$ oproti $20,5 \pm 0,9 \text{ mg.g}^{-1}$ u H v LV) (Graf 6D); v LV samotná hypoxie způsobila statisticky významný nárůst jejich koncentrace. Koncentrace nerozpustných proteinů v ECM u kontrol činila $22,4 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV, $20,5 \pm 0,9 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV, u kontrol s batimastatem $21,5 \pm 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $24,7 \pm 1,6 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV.

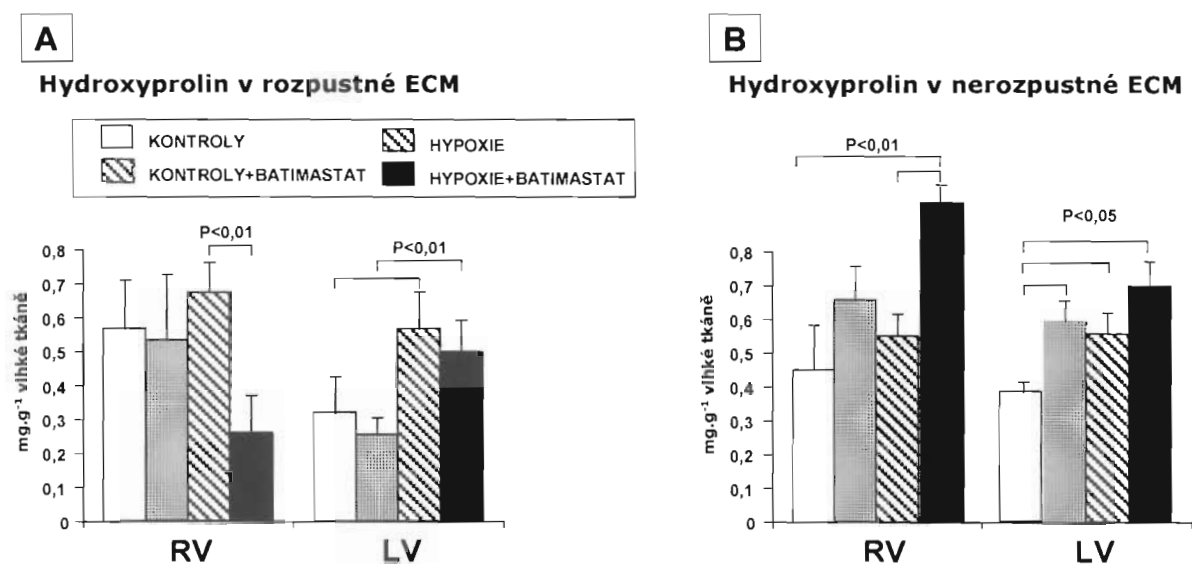


Graf 6: Efekt chronické 3týdenní hypoxie za současného podávání batimastatu na koncentraci proteinů. Koncentrace metabolických (A) a kontraktilních proteinů (B), rozpustných proteinů extracelulární matrix (C) a nerozpustných proteinů extracelulární matrix (D). Koncentrace je vyjádřena v mg.g^{-1} vlhké hmotnosti srdeční tkáně, obsah v mg. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM.

4.2.3 KONCENTRACE SRDEČNÍHO KOLAGENU

Kvantitativní změny kolagenních molekul byly stanoveny pomocí hydroxyprolinu (Graf 7). Zatímco koncentrace rozpustných kolagenních proteinů v LV vlivem hypoxie i hypoxie s batimastatem byla vyšší ($0,57 \pm 0,14 \text{ mg.g}^{-1}$ u K; $0,53 \pm 0,19 \text{ mg.g}^{-1}$ u K+B; $0,67 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$ u H; $0,25 \pm 0,11 \text{ mg.g}^{-1}$ u H+B), v RV žádné rozdíly nebyly pozorovány (Graf 7 A), pouze u skupiny hypoxické léčené batimastatem došlo ke snížení koncentrace hydroxyprolinu v porovnání s hypoxií samotnou ($0,32 \pm 0,11 \text{ mg.g}^{-1}$ u K; $0,26 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ u K+B; $0,57 \pm 0,11 \text{ mg.g}^{-1}$ u H; $0,5 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ u H+B). Změny kolagenních proteinůve frakci nerozpustné ECM (Graf 7 B) byly podstatně bohatší.

Inhibice MMP batimastatem za současného působení hypoxie způsobila zvýšení koncentrace kolagenů v RV i LV ($0,90 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ oproti $0,55 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ u H v RV a $0,7 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ oproti $0,56 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ u H v LV. V LV však došlo ke zvýšení koncentrace i samotnou hypoxií a normoxií s podáváním batimastatu. Koncentrace u kontrol činila $0,45 \pm 0,13 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $0,39 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV, pro normoxické kontroly s batimastatem $0,66 \pm 0,10 \text{ mg.g}^{-1}$ v RV a $0,6 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ v LV.

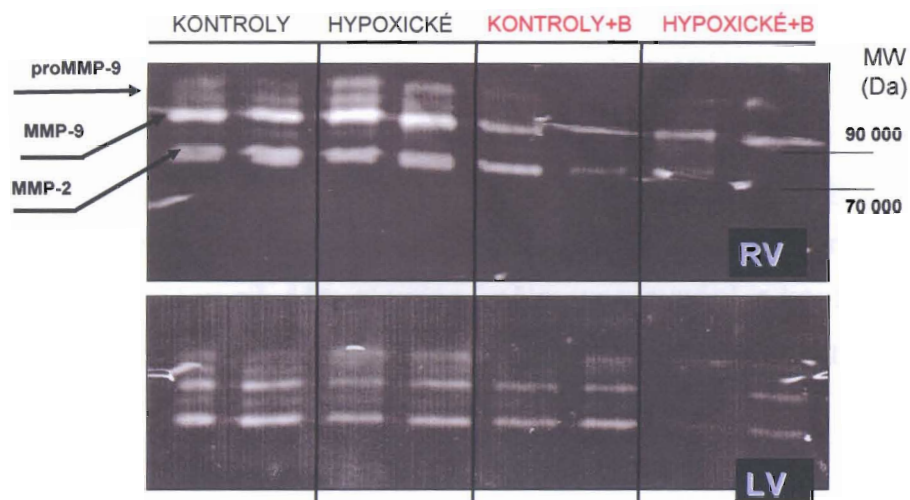


Graf 7: Koncentrace kolagenu ve frakci rozpustných (A) a nerozpustných (B) proteinů ECM v srdeční tkáni po 3týdenní hypoxii a podávání batimastatu. Koncentrace kolagenu byla určena stanovením hydroxyprolinu (mg.g^{-1} vlhké hmotnosti). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM.

4.2.4 ZYMOGRAFIE MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ NA ŽELATINĚ

Zymografií na polyakrylamidovém gelu (10 %) s želatinou byly detekovány lytické zóny odpovídající aktivním i proaktivním formám MMP-2 (oblast 70 kDa) a MMP-9 (oblast 90 kDa). Z gelu je patrné, že hypoxie způsobila zvýšení aktivity obou MMP a jejich proforem v RV i LV, inhibice batimastatem naopak snížení v obou komorách jak

u normoxických, tak hypoxických zvířat, v LV hypoxických zvířat léčených batimastatem lytické zóny téměř vymizely (Obrázek 12).



Obrázek 12: Reprezentativní zymografický PAGE gel (10 %) s lytickými zónami matrixových metaloproteináz z extraktu pravé (RV) a levé (LV) komory srdeční a vliv 3týdenní hypoxie a podávání batimastatu na jejich zymografickou aktivitu.

4.3. DLOUHODOBÁ APLIKACE METAMFETAMINU LABORATORNÍMU POTKANOVÍ

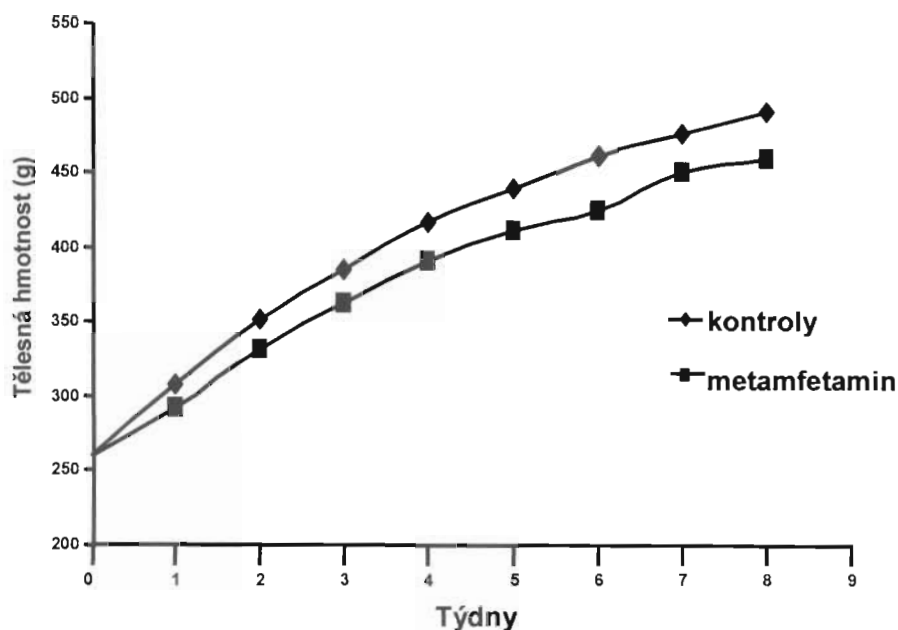
4.3.1 VLIV APLIKACE METAMFETAMINU NA TĚLESNOU HMOTNOST A HMOTNOST SRDCE

Výsledkem podávání metamfetaminu (MA) po dobu 9 týdnů bylo relativní snížení tělesné hmotnosti v porovnání s kontrolní skupinou o 9,8 % (Tabulka 10). Zvyšování hmotnosti po dobu experimentu probíhalo plynule, zjistili jsme nižší hmotnostní přírůstky u MA skupiny (Graf 8). Zároveň MA skupina měla v porovnání s kontrolní skupinou nižší hmotnost srdce, ale relativní hmotnost srdce se nezměnila. Nebyl nalezen žádný statistický rozdíl mezi ostatními hmotnostními parametry srdce.

Tabulka 10: Vliv podávání metamfetaminu na tělesnou hmotnost a hmotnostní parametry srdce.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, BW - tělesná hmotnost, HW – absolutní hmotnost srdce, RV - hmotnost pravé komory srdce, LV - hmotnost levé komory srdce (bez septa), HW/BW – relativní HW, RV/BW - relativní hmotnost pravé komory, LV/BW – relativní hmotnost levé komory, RV/LV – poměr hmotnosti RV ku LV. Hladiny statistické významnosti: $^{\wedge}$ p<0,05 rozdílné od kontrol; t-test.

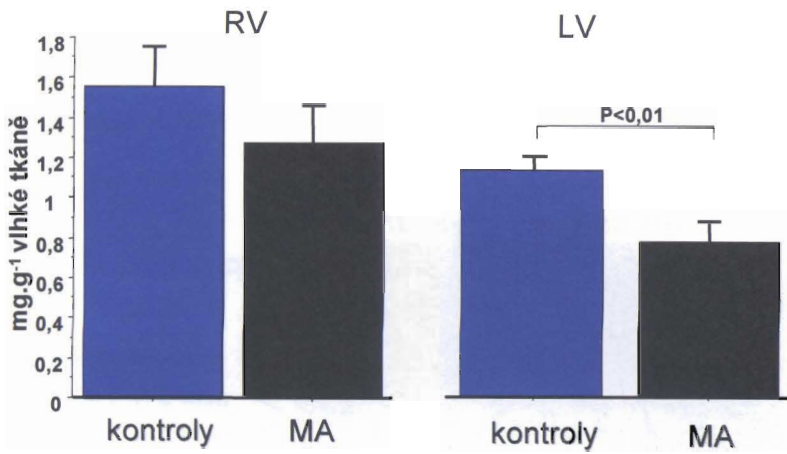
skupina	počet	BW g	HW mg	HW/BW mg.g ⁻¹
Kontroly	16	490,27 \pm 11,59	1178 \pm 24	2,37 \pm 0,05
Metamfetamin	24	447,00 \pm 6,86 ^A	1085 \pm 19 ^A	2,45 \pm 0,04
		RV/BW mg.g ⁻¹	LV/BW mg.g ⁻¹	RV/LV
Kontroly	16	0,54 \pm 0,02	1,26 \pm 0,03	0,43 \pm 0,02
Metamfetamin	24	0,54 \pm 0,02	1,27 \pm 0,04	0,43 \pm 0,02



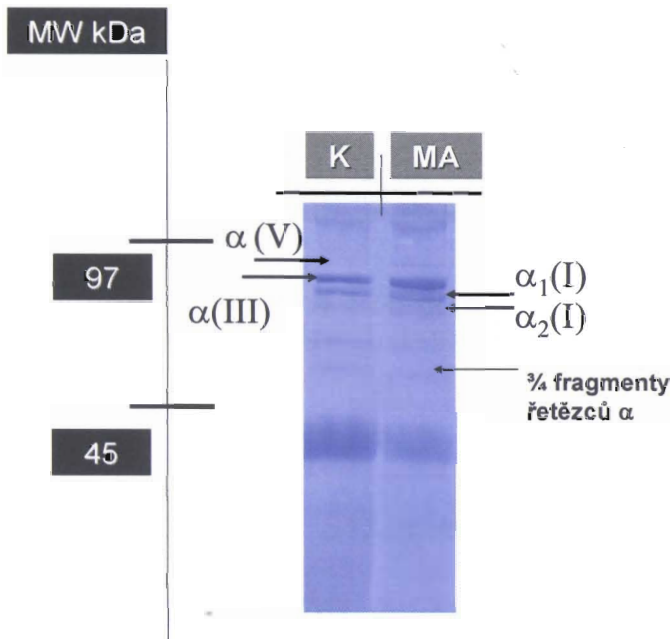
Graf 8: Tělesná hmotnost potkanů v průběhu 9 týdnů podávání metamfetaminu.

4.3.2 VLIV PODÁVÁNÍ METAMFETAMINU NA KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ ZASTOUPENÍ KOLAGENNÍCH PROTEINŮ

Podávání MA vedlo ke kvantitativním změnám kolagenních proteinů pouze v LV, kde koncentrace hydroxyprolinu klesla o 32 %. V RV pokles nebyl statisticky významný (Graf 9). Po elektroforetickém rozdělení extraktu kolagenů ze srdeční tkáně byly v obou komorách detekovány kolageny typu I, III a V (Obrázek 13). Semikvantitativní analýzou (analýzou obrazu) bylo zjištěno, že v RV došlo ke zvýšení α_2 řetězce kolagenu typu I a v LV α řetězce kolagenu typu III u skupiny, které byl podáván metamfetamin.



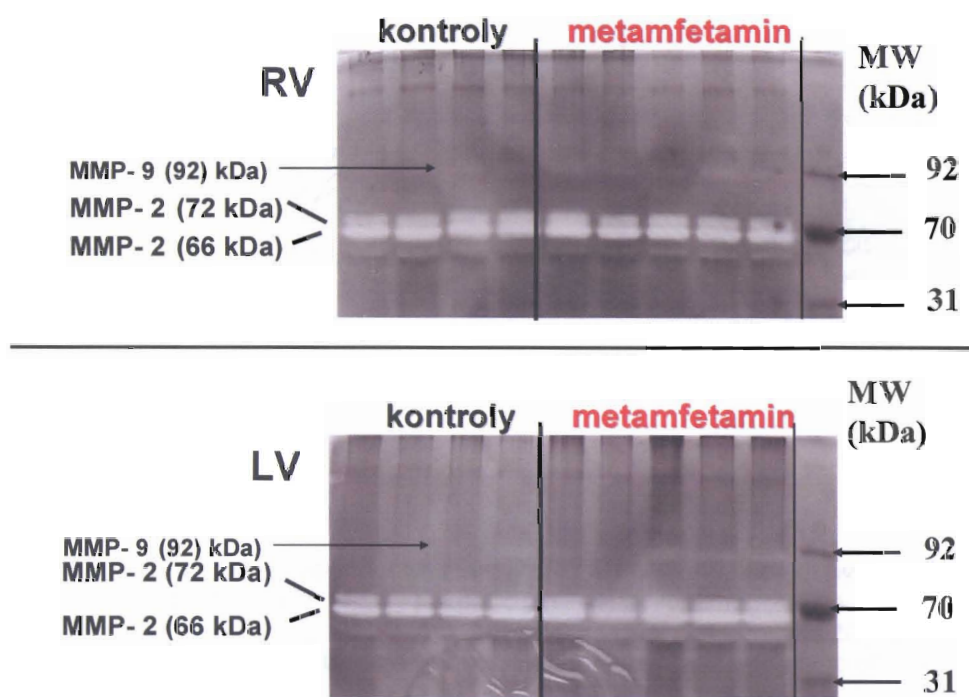
Graf 9: Koncentrace celkového hydroxyprolinu v srdeční tkáni potkana po podávání metamfetaminu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM.



Obrázek 13: Reprezentativní elektroforeogram kolagenů extrahovaných ze srdeční tkáně levé komory. K - kontrola, MA - skupina s aplikací metamfetaminu.

4.3.3 ZYMOGRAFIE MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ

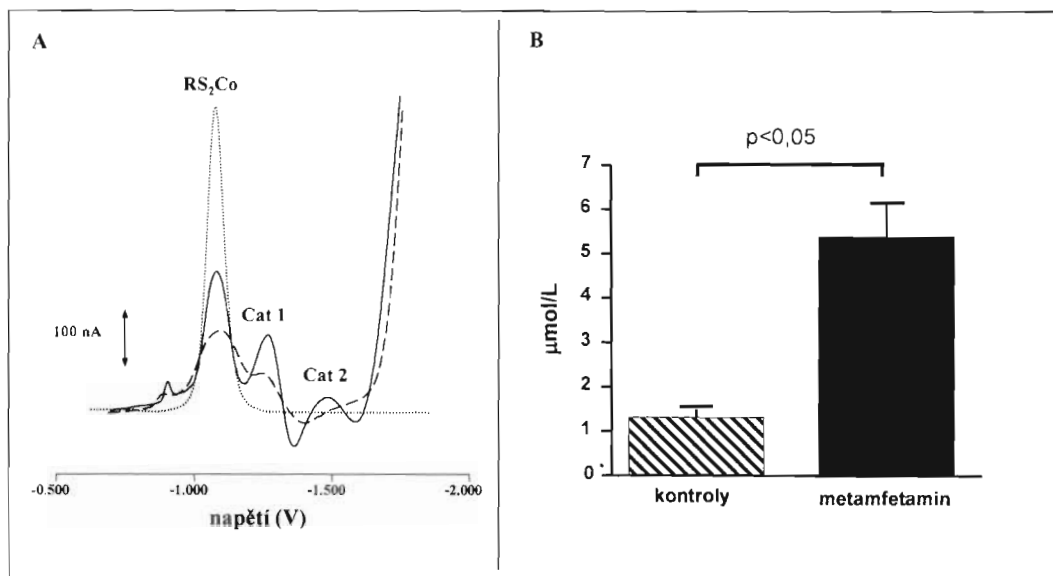
Aktivita MMP-2 byla detekována na zymografickém gelu (koncentrace 7,5 %) v podobě 2 lytických zón: 72 kDa (proforma) a 66 kDa (aktivní forma); žádné rozdíly v aktivitě enzymů nebyly nalezeny (Obrázek 14). Dále byly přítomny i velmi slabé lytické zóny odpovídající MMP-9 (92kDa).



Obrázek 14: Reprezentativní zymografický PAGE gel (7,5 %) s lytickými zónami matrixových metaloproteináz z extraktu pravé (RV) a levé (LV) komory srdeční a vliv podávání metamfetaminu na jejich zymografickou aktivitu.

4.3.4 STANOVENÍ METALOTHIONEINU

V krevním séru potkanů byly pozorovány 3 katalytické signály adsorbovaného metalothioneinu (čas akumulace byl 120 s). Získaný voltamogram je uveden na obrázku (Obrázek 15A). Pro další kvantitativní analýzu byl použit katalytický signál Cat 2. Závislost výšky píku Cat 2 na koncentraci MT byla lineární ($y = 5,52x + 0,72$; $R^2=0,9918$). Průměrná hodnota koncentrace činila $1,3 \pm 0,19 \mu\text{mol/l}$ u kontrolních potkanů, $5,4 \pm 0,72 \mu\text{mol/l}$ u potkanů, kterým byl podáván MA. Koncentrace zde byla 4,15x vyšší než u kontrol (Obrázek 15B).



Obrázek 15: Typický DPV voltamogram z analýzy MT u potkanů, kterým byl podáván metamfetamin a u potkanů kontrolních (A). MA (____), kontroly (-----) a voltamogram podpůrného elektrolytu obsahujícího $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ bez MT (.....). Analytický signál Cat 2 byl použit pro kvantifikaci MT. Koncentrace MT u kontrol a skupiny s MA (B). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM.

4.4. SOUBOR PACIENTŮ S PORUCHOU LIPIDOVÉHO METABOLIZMU

4.4.1 PARAMETRY LIPIDOVÉHO SPEKTRA

U skupiny pacientů léčených dietním režimem se hladiny lipidů statisticky významně nezměnily: průměrná hodnota koncentrace celkového cholesterolu před léčbou byla 5,61 mmol/l a po léčbě 5,48 mmol/l; koncentrace HDL-cholesterolu se také výrazně nezměnila. Ani v případě LDL-cholesterolu i triacylglycerolů nebyla změna signifikantní (Tabulka 11).

U pacientů léčených hypolipidemiky byl 3 měsíce po zahájení léčby zaznamenán signifikantní pokles celkového cholesterolu z průměrných hodnot 7,17 mmol/l na 6,14 mmol/l, LDL-cholesterolu z 4,60 mmol/l na 3,81 mmol/l. Průměrná koncentrace HDL-cholesterolu se nezměnila. Pokles koncentrace triacylglycerolů z 3,12 mmol/l na 2,13 mmol/l byl také významný (Tabulka 12).

Tabulka 11: Parametry lipidového spektra u zdravých kontrolních osob a pacientů s dyslipoproteinémií (DLP). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, ^Ap<0,05 rozdílné od kontrol; t-test.

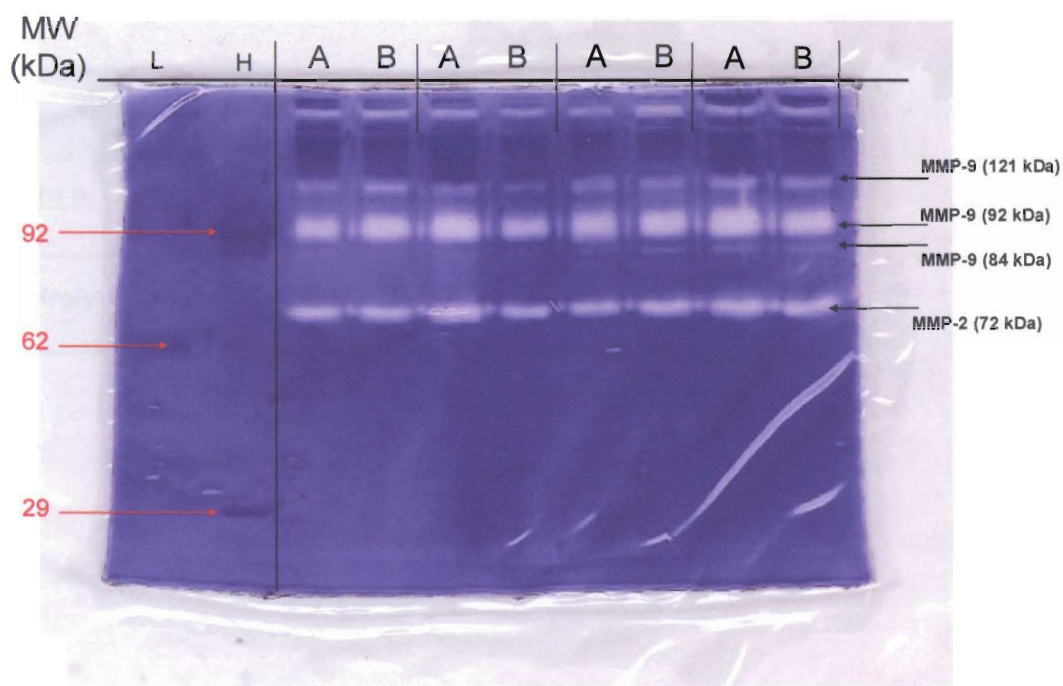
	DLP pacienti před terapií	kontroly
n	40	40
Věk	51,5 \pm 19	43 \pm 15
Pohlaví (n, muži/ženy)	20/20	20/20
Cholesterol (mmol/l)	6,39 \pm 0,23 ^A	4,66 \pm 0,79
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,37 \pm 0,59	1,42 \pm 0,58
LDL-cholesterol (mmol/l)	4,05 \pm 0,21 ^A	2,76 \pm 0,08
Triacylglyceroly (mmol/l)	2,68 \pm 0,38 ^A	1,26 \pm 0,07

Tabulka 12: Charakteristika pacientů s DLP před a 3 měsíce po léčení dietním opatřením nebo farmakoterapií. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, ^Ap<0,05 rozdílně od kontrol; t-test.

	n	Celkový cholesterol (mmol/l)	HDL-cholesterol (mmol/l)	LDL-cholesterol (mmol/l)	Triacylglyceroly (mmol/l)
DLP pacienti před dietou	20	5,61 ± 0,26	1,36 ± 0,08	3,49 ± 0,23	2,24 ± 0,53
DLP pacienti 3 měsíce po dietě	20	5,48 ± 0,24	1,33 ± 0,07	3,43 ± 0,21	1,72 ± 1,20
DLP pacienti před farmakoterapií	20	7,17 ± 0,28	1,38 ± 0,09	4,60 ± 0,32	3,12 ± 0,55
DLP pacienti 3 měsíce po farmakoterapii	20	6,14 ± 0,21 ^A	1,38 ± 0,08	3,81 ± 0,18 ^A	2,13 ± 0,26 ^A

4.4.2 ZYMOGRAFICKÁ AKTIVITA MMP V SÉRU PACIENTŮ S DLP

Při provádění zymografie bylo třeba přizpůsobit metodu používanou k extrakci MMP z tkáně a vyizolovat MMP ze séra (kapitola 3.3.8). Ředěním vzorků séra kakodylátovým pufrům v různém poměru bylo dosaženo optimálních výsledků a dostatečné ostrosti lytických zón. Zymografií byla prokázána aktivita želatinázy A (MMP-2) a želatinázy B (MMP-9) v místě výskytu lytických zón (Obrázek 16). Aktivita MMP-9 byla přítomna v podobě 3 lytických zón o molekulové hmotnosti 121, 92 a 84 kDa. Nedá se jednoznačně říci, že farmakoterapie způsobila pokles zymografické aktivity, spíše byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými lytickými zónami. Aktivita želatinázy A (MMP-2) byla reprezentována lytickou zónou o molekulové hmotnosti 72 kDa. Rozdíly v aktivitě MMP-2 mezi pacienty před farmakoterapií a po farmakoterapii nebyly pozorovány.



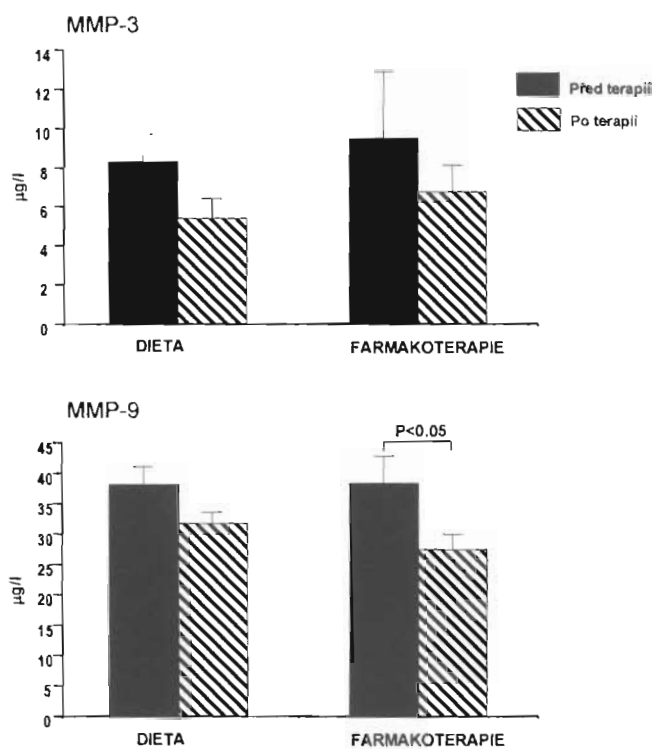
Obrázek 16: Reprezentativní zymografie matrixových metaloproteináz na gelu s želatinou (koncentrace polyakrylamidu 7,5 %) s želatinou v krevním séru pacientů s DLP před léčbou statiny (A) a po 3 měsíční léčbě (B). L – nízkomolekulový proteinový marker, H – vysokomolekulový proteinový marker.

4.4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE MMP-3 A MMP-9 U ZDRAVÝCH JEDINCŮ A PACIENTŮ S DYSLIPOPROTEINÉMIÍ; VLIV DIETY A FARMAKOTERAPIE

Koncentrace MMP-3 byla nižší u kontrolního souboru než u souboru pacientů s dyslipoproteinémií (DLP). Statisticky významný byl rozdíl sérových koncentrací MMP-9 mezi zdravými jedinci a pacienty s DLP (Tabulka 13). Koncentrace MMP-3 činila před dietním zásahem $8,31 \pm 1,36 \mu\text{g/l}$, po dietě $5,40 \pm 0,99 \mu\text{g/l}$, pokles nebyl statisticky významný (Graf 10). Ani farmakoterapií nedošlo k významné změně ($9,5 \pm 3,40 \mu\text{g/l}$ versus $6,76 \pm 1,32 \mu\text{g/l}$). Pokles koncentrace MMP-9 byl statisticky významný, z $38,32 \pm 4,50 \mu\text{g/l}$ před terapií na $27,36 \pm 2,58 \mu\text{g/l}$ po terapii hypolipidemiky, vliv dietního režimu nebyl statisticky potvrzen, koncentrace před dietou činila $38,18 \pm 2,84 \mu\text{g/l}$, po dietě $31,69 \pm 1,90 \mu\text{g/l}$ (Graf 10).

Tabulka 13: Koncentrace MMP-3 a MMP-9 u pacientů s DLP a kontrolních osob. n= počet subjektů v souboru. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, ^Ap<0,05 rozdílné od kontrol; t-test.

	n	MMP-3 ($\mu\text{g/l}$)	MMP-9 ($\mu\text{g/l}$)
Pacienti s DLP	40	$8,90 \pm 1,81$	$36,66 \pm 2,67$
Zdravé kontroly	40	$7,52 \pm 0,71$	$16,33 \pm 1,72^A$



Graf 10: Koncentrace MMP-3 a MMP-9 u pacientů s DLP před dietním zásahem a po dietě a u pacientů s DLP před farmakoterapií a po farmakoterapii. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM; t-test.

4.5. SOUBOR PACIENTŮ S TRAUMATICKÝM POŠKOZENÍM MOZKU

4.5.1 KONCENTRACE METALOTHIONEINU U PACIENTŮ S PORANĚNÍM MOZKU

Průměrná koncentrace metalothioneinu v séru pacientů ze skupiny I (GCS =15) se statisticky nelišila ($p < 0,25$) od skupiny II (GCS < 15) během prvních 3 dnů po poranění ani 4.-8. den po poranění. Ovšem při porovnání hodnot 1.-3. den a 4.-8. den došlo ke zvýšení koncentrace MT u obou skupin, u skupiny II bylo toto zvýšení statisticky významné (Tabulka 14).

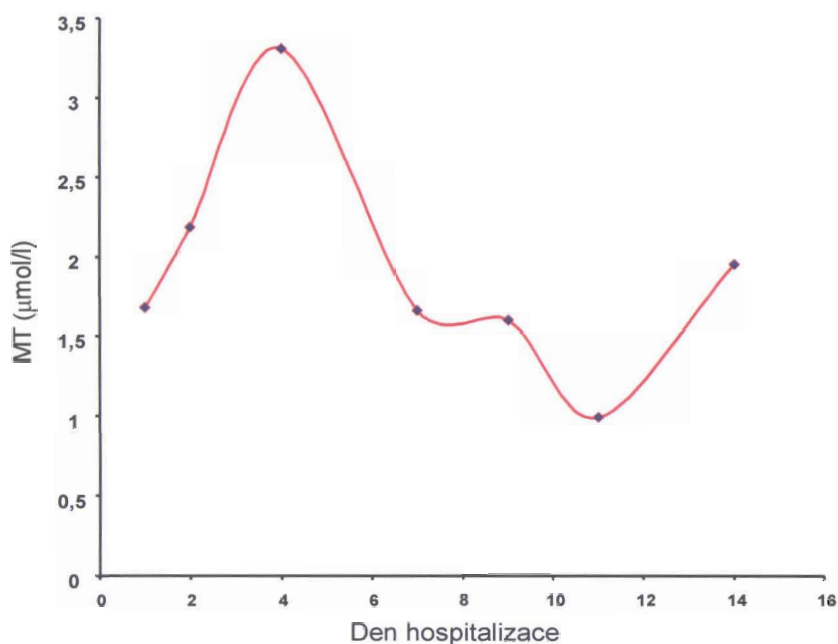
Tabulka 14: Průměrné hodnoty metalothioneinu během hospitalizace pacientů s TBI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, ^A $p < 0,05$ 1.-3. den vs. 4.-8. den; t-test.

	MT ($\mu\text{mol/l}$) 1.-3. den	MT ($\mu\text{mol/l}$) 4.-8. den
Skupina I	0,811 \pm 0,184	1,462 \pm 0,306 ^A
Skupina II	1,157 \pm 0,205	1,423 \pm 0,228

U 3 pacientů ze skupiny II, u kterých bylo diagnostikováno difuzní-axonální poranění mozku byly hladiny MT zvýšené až kolem 3 $\mu\text{mol/l}$. Časový vývoj hodnot během hospitalizace jednoho z pacientů je znázorněn v tabulce (Tabulka 15).

Tabulka 15: Časově závislý profil koncentrace MT během hospitalizace u pacienta s diagnózou difuzního-axonálního poranění mozku.

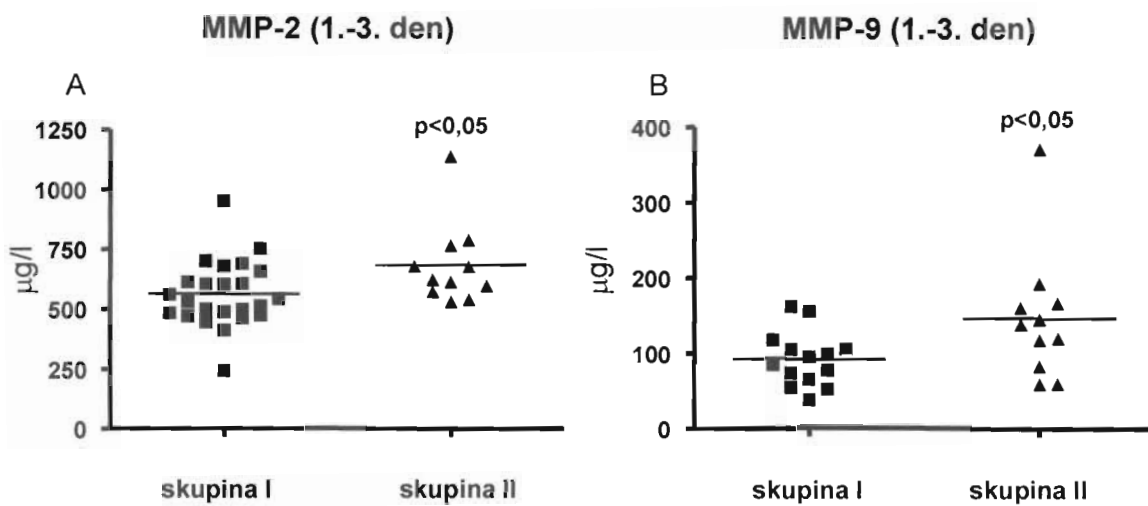
Den	1	2	4	7	9	11	14
MT (μmol/l)	1,679	2,183	3,305	1,662	1,599	0,989	1,951



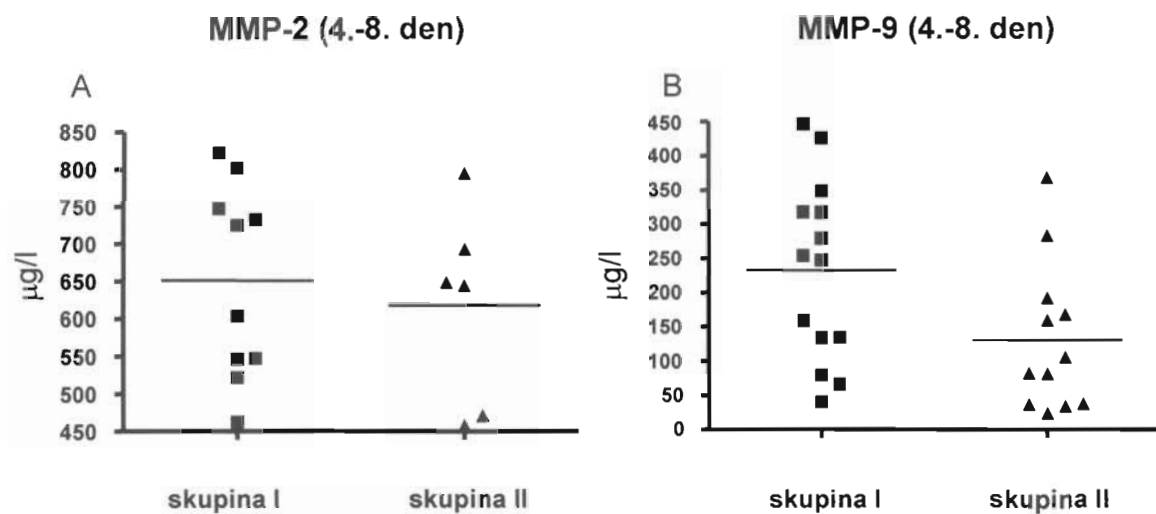
4.5.2 KONCENTRACE MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ U PACIENTŮ S PORANĚNÍM MOZKU

Koncentrace MMP-2 během 1.-3. dne u pacientů ze skupiny I (s mírnějším poraněním mozku) byla $561,5 \pm 28,30 \mu\text{g/l}$. U skupiny II (pacientů se závažnějším poraněním mozku) byla naměřena průměrná koncentrace MMP-2 $682,5 \pm 51,99 \mu\text{g/l}$ (Graf 11A). Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ($p < 0,05$). Také průměrná koncentrace MMP-9 během 1.-3. dne (Graf 11) se statisticky lišila u skupiny I a II ($92,80 \pm 9,73 \mu\text{g/l}$ oproti $146,5 \pm 26,01 \mu\text{g/l}$).

Během 4.-8. dne hospitalizace již nebyly nalezeny žádné rozdíly ani v koncentracích MMP-2 ($651,2 \pm 40,77 \mu\text{g/l}$ versus $617,9 \pm 53,41 \mu\text{g/l}$) ani u MMP-9 ($232,6 \pm 35,23 \mu\text{g/l}$ oproti $130,6 \pm 31,27 \mu\text{g/l}$) mezi skupinou I a skupinou II pacientů s traumatickým poškozením mozku (Graf 12).



Graf 11: Koncentrace MMP-2 a MMP-9 v séru u pacientů s TBI 1.-3. den hospitalizace. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM, $p < 0,05$ skupina I vs. skupina II; t-test.



Graf 12: Koncentrace MMP-2 a MMP-9 v séru u pacientů s TBI 4.-8. den hospitalizace. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, $p < 0,05$ skupina I vs. skupina II; t-test.

5. Diskuse

5.1. EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 4DENNÍ HYPOXII A 4DENNÍ HYPOXII S HYPERKAPNIÍ

Chronická 4denní hypoxie a hypoxie s hyperkapnií indukovaly změny v hmotnostních parametrech srdce, proteinové kompozici srdeční extracelulární matrix, koncentraci kolagenů a v genové expresi kolagenů, změny v expresi a aktivitě matrixových metaloproteináz.

Je známo, že zvýšená tlaková zátěž během hypoxií indukované rezistence pulmonálního řečiště vede k pravostranné hypertrofii (Pelouch et al., 1997). Zvýšená hmotnost pravé komory byla dokumentována po 7, 10 dnech a 3 týdnech expozice izobarickým (normobarickým) hypoxickým podmínkám (Johnson et al., 1983, Stockmann et al., 1988, Kukacka et al., 2002). Někteří autoři dokonce zjistili pravokomorovou hypertrofii již po 5 dnech (Sheedy et al., 1996), my jsme zjistili, že i krátkodobá chronická hypoxie (4 dny) vede k hypertrofii pravé komory. Navíc 4denní expozice hypoxickým podmínkám vedla k poklesu tělesné hmotnosti zvířat. Bylo to zřejmě způsobeno sníženým příjmem potravy a vody v normobarické komoře. V našem experimentu došlo k vyšší růstové retardaci u zvířat vystavených vyšší koncentraci CO₂; hyperkapnie tedy přispěla ke snížení tělesné hmotnosti. Zatímco toto může být stresový faktor v první části aklimatizace na chronickou hypoxii, hyperkapnie v kombinaci s chronickou hypoxií měla protektivní charakter. Rozdíly mezi tělesnou hmotností kontrolních a experimentálních zvířat žijících po dlouhou dobu v hypoxických-hyperkapnických podmínkách se výrazně lišily od těch, co žili jen v hypokapnických (Neckar et al., 2003).

Absolutní hmotnost srdce nebyla pozorována u hypoxických potkanů, ale relativní hmotnost stejně jako relativní hmotnost pravé i levé komory byly zvýšeny. Toto byl výsledek nižší tělesné hmotnosti jak u hypokapnických, tak hyperkapnických zvířat. Zvýšená relativní hmotnost v hypokapnii byla zřejmě způsobená jen zvýšením hmotnosti pravé komory, v hyperkapnii zvýšením RV i LV. Doposud nejsou známa žádná přímá experimentální data, která by uváděla informace o zvýšeném tlaku v pulmonální cirkulaci

v prvních chvílích hypoxie, ale potlačená reaktivita na hypoxický podnět (v rozsahu 0-10 % O₂) a jiné rezistivní vlastnosti plicního řečiště byly posunuty směrem k vyšším tlakům u hypoxických zvířat vystavených 5 dnů izobarické hypoxii (Lachmannova and Herget, 2002). Na druhé straně chronická hypoxie v eukapnii indukovala pravokomorovou kardiomegalii hypertenzi v pulmonální cirkulaci, která byla následkem pulmonální vasokonstrikce a morfologické a biochemické remodelace plicních cév (Adnot et al., 1991, Ooi et al., 2000). Podobné výsledky byly pozorovány u zvířat po působení chronické intermitentní hyperkapnické hypoxie (McGuire and Bradford, 2001), ale pravokomorová hypertrofie zde byla méně vyvinuta než u eukapnických hypoxických zvířat (Nattie et al., 1978, Baudouin and Bateman, 1989).

Hypoxie je stimul pro sekreci ANP v srdci. Některé studie *in vitro* prokázaly, že hypoxický stimul může přímo indukovat genovou expresi ANP bez přítomnosti hemodynamických, neurálních nebo hormonálních vlivů (Lew and Baertschi, 1989, Chen et al., 1997). Analyzovali jsme mRNA ANP proto, abychom ověřili, zda zvolený hypoxický stimul na srdeční komory byl dostatečný, a dále proto, zda v komoře nastaly hypertrofické změny, protože některé práce uvádějí, že mRNA ANP je senzitivní indikátor těchto změn (Ruskoaho et al., 1997). Absence odpovědi srdečních komor na expresi mRNA ANP během hypoxie v naší studii by mohla být výsledkem nedostatečného hypoxického stimulu. Některé studie *in vivo* totiž ukázaly, že kratší hypoxický stimul než 4 dny neměl žádný vliv na expresi genu pro ANP (Johnson et al., 1997). V naše práci jsme sice neanalyzovali vliv izolované hyperkapnie na genovou expresi ANP nebo jeho plazmatickou koncentraci, ale existují práce, které dokumentují vzrůst genové exprese ANP až o 100 % vlivem hyperkapnických podmínek (Clozel et al., 1989). V naší studii jsme pozorovali vysoce zvýšenou expresi genu ANP v pravé komoře hypoxických-hyperkapnických potkanů, což jednoznačně svědčí o přítomnosti hemodynamických změn v této části srdce, pravděpodobně na základě zvýšených tlaků při plnění srdce (Chabot et al., 1995).

Změny hmotnostních parametrů srdce byly doprovázeny proteinovou remodelací srdeční svaloviny. Kromě toho byla pozorována změněná genová exprese obou hlavních srdečních kolagenů a matrixových metaloproteináz. Chronická hypoxie je významným stimulem pro kvantitativní i kvalitativní přestavbu myokardu. Prokázali jsme, že krátkodobá hypoxie je schopna vyvolat proteinové změny ve skupině, kde současně působila hyperkapnie. ECM srdečního svalu je složena z různých kolagenů,

proteoglykanů, glykoproteinů a elastinu. Všechny tyto komponenty mají různé strukturní subtypy, které jsou v některých případech specificky exprimovány jenom v srdeční tkáni, jiné jsou pro srdeční tkáň typické, i když se nacházejí i v jiných tkáních (např. kolagen I a III). Řada enzymů participuje na degradaci složek kardiální ECM a celá řada růstových faktorů naopak umožňuje jejich syntézu a lokalizaci v ECM srdeční tkáně (Kukacka et al., 2005). Izolace pepsinem rozpustné a pepsinem nerozpustné frakce proteinů ECM se současnou analýzou hydroxyprolinu v nich a s technikami molekulové biologie (průkaz mRNA pro různé typy kolagenů) umožnila analyzovat biochemický charakter ECM a její remodelaci pod vlivem hypoxických podmínek. Tři různé přeměny proteinové skladby by mohly nastat v hypoxickém myokardu: a) kvantitativní přeměny proteinů ECM, b) kvantitativní změny celkového kolagenu nebo jednotlivých jeho typů, c) kvalitativní změny proteinů ECM. 4 dny hypoxie změnilo proteinový profil ECM pouze u skupiny hypoxicko-hyperkapnické; tyto změny se týkaly pravé komory. Proteinová přestavba ECM byla charakterizována vyšší koncentrací rozpustných proteinů ECM, tedy frakce, která je zastoupena především nově syntetizovanými molekulami. To vyplynulo jak z analýzy hydroxyprolinu, tak z analýzy mRNA. Nejvíce je zvýšena syntéza elastičtějšího kolagenu typu III. Zvýšení syntézy tohoto kolagenu je typické pro vznik hypertrofie myokardu (Pelouch and Jirmar, 1993). Tato změna je patrná již v době, kdy není pozorována žádná změna v absolutních hmotnostech jednotlivých komor. Funkční vlastnosti jednotlivých kolagenů v srdeční tkáni nejsou ještě zcela pochopeny. Na druhé straně koncentrace celkového hydroxyprolinu v tkáni RV hypoxicko-hyperkapnických potkanů poklesla, růst nekolagenních a kolagenních složek myokardu je disproporční. Krátkodobá hypoxie v naší experimentální sestavě způsobila zvýšení množství maturovaného, tedy kolagenního materiálu s vyšším množstvím příčných vazeb („cross-links“), to pravděpodobně přispělo k redukci jeho degradace. Množství kolagenních proteinů v myokardu je výsledkem mnoha faktorů dynamické rovnováhy mezi jejich syntézou a odbouráváním. Různé kolagenázy (především MMP-1, MMP-8 nebo MMP-13) nebo želatinázy se společně se svými tkáňovými inhibitory podílejí na remodelaci biochemické skladby ECM v hypoxickém myokardu (Tyagi et al., 1997, Rouet-Benzineb et al., 1999, Kukacka et al., 2005). Tento stav hypoxické srdeční tkáně může být aktivován také různými ROS nebo změnami hladin natriuretických hormonů či cytokinů (Rajagopalan et al., 1996, Kinugawa et al., 2000). MMP-9 je inaktivována především tvorbou specifického komplexu s TIMP-1. Ovšem TIMP-1 mRNA nemusí vždy korespondovat s poklesem

aktivity MMP (Nishikawa et al., 2003). Potlačení genové exprese pro MMP-2 a TIMP-1 bylo pozorováno v RV během obou experimentálních přístupů. Nemůžeme jednoznačně říci, zda tyto změny na úrovni mRNA korespondují s koncentrací samotného proteinu, protože pro MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 neexistuje pozitivní korelace mezi množstvím proteinu a mRNA (Lichtinghagen et al., 2002, Greenbaum et al., 2003). Kromě toho zvláště matrixové metaloproteinázy prodělávají mnoho různých potranskripčních a potranslačních úprav, než dojde skutečně ke vzniku funkční proteinové molekuly z primárního transkriptu. Tím se velmi může lišit jejich biologický poločas *in vivo*, zároveň jsou to enzymy, které jsou na různých úrovních *in vivo* aktivovány a inhibovány množstvím nezávislých mechanismů (Kukacka et al., 2005). Můžeme se domnívat, že MMP-2 má vyšší aktivitu specificky v RV kontrolní skupiny proto, že poklesla exprese mRNA pro MMP-2 a TIMP-1 právě v RV zvířat vystavených 4denní hypoxii a že došlo zároveň ke zvýšení koncentrace kolagenu. Tyto změny vznikly bez závislosti na koncentraci CO₂.

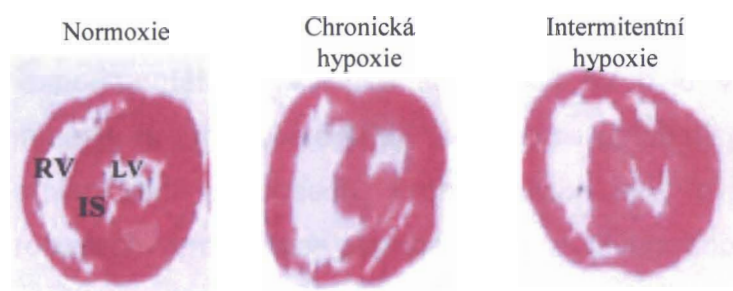
Vliv ANP na proteinovou remodelaci myokardu není jednoznačný. Bylo dokázáno, že vrůst množství ANP potlačuje syntézu kolagenu, která je typická pro hypoxii indukovanou přeměnu srdeční tkáně (Ogawa et al., 2000, Ogawa et al., 2001). Syntéza kolagenů typu I a III potkaními srdečními fibroblasty ve tkáňové kultuře byla stimulována hypoxií a stimulační efekt byl navíc ovlivněn přítomností ANP nebo BNP v kultivačním médiu (Nakagawa et al., 1995). Naše výsledky, kdy pravokomorová hypertrofie vyvolaná hypoxií-hyperkapnií je spojena se vzrůstem ANP mRNA a zároveň kolagenem III mRNA, jsou zcela nové. Nemůžeme však jednoznačně říci, zda tyto změny ANP jsou přímo zodpovědné za biochemickou remodelaci ECM. K tomu by bylo potřeba dalších experimentů.

5.2. EXPOZICE LABORATORNÍHO POTKANA 3TÝDENNÍ HYPOXII - VLIV BATIMASTATU

Z našeho experimentu vyplynulo, že podávání inhibitoru matrixových metaloproteináz batimastatu ovlivní srdeční hypertrofii u hypoxických zvířat. Ta vzniká jako kompenzační mechanismus srdeční tkáně na tlakové a objemové přetížení myokardu. Chronická hypoxie po 3 týdnech působení vyvolala u potkanů pravostrannou hypertrofii srdeční komory, což je v souladu i s jinými pracemi (Morrell et al., 1995, Blumberg et al., 2002, Herget et al., 2003). Ty dokumentují vasokonstrikci a strukturální remodelaci při chronické hypoxii v pulmonální cirkulaci, měnící se pulmonální hemodynamiku vedoucí k plicní hypertenzi a selektivní hypertrofii RV. Navíc pulmonální vasokonstrikce

a systémová vasodilatace při expozici hypoxii ještě stimulují erythropoézu, která vede k polycytemii spojené se zvýšením viskozity krve (Barer et al., 1983, Winslow et al., 1984). Kromě hypertrofie RV, jejíž relativní hmotnost byla zvýšená o 37 %, došlo i ke zvýšení hmotnosti LV (o 15 %). Tento rozdíl je v souladu s faktem, že každá z komor se nalézá v podmínkách chronické hypoxie v poměrně odlišných hemodynamických situacích. Za fyziologických podmínek je systolická a diastolická zátěž vyšší u LV než u RV, komorové septum se stává konkávnějším s ohledem na centrum prohlubně LV, výsledkem je relativně okrouhlý krátkoosý příčný řez levé komory (Lima et al., 1986). Naopak expozice chronické hypoxii indukuje tlakové přetížení RV a zhoršení plnění LV na úkor normální systolické fáze, protože se septum posouvá levostranně bez znatelného zhoršení systolické funkce LV *per se*. Funkční a strukturální odlišnost obou komor je patrná i z našeho experimentu, kdy podáváním inhibitoru došlo za současného působení hypoxie k redukci pravostranné hypertrofie, naopak ke zvýšení relativní hmotnosti LV. Tato změna může souviset především s odlišnou proteinovou skladbou obou komor a konečně i s lišícím se procesem remodelace komorové tkáně a úlohou MMP v ní. Celý proces remodelace můžeme rozdělit na tři fáze. Během počátečního stadia se zvyšuje aktivita MMP a dochází k degradaci kolagenu. Následuje stadium kompenzace, které je charakterizováno návratem aktivity MMP a koncentrace kolagenu k normálním hodnotám. Po vyčerpání kompenzačních mechanismů je typický opět nárůst aktivity MMP a postupná fibrotizace tkáně (Potáčová et al., 2005). Hypertrofie u tlakového přetížení je koncentrického rázu, dochází k zesílení stěny komory bez zvětšení objemu komory.

Zesílení komorové stěny je výsledkem zvětšení průměru myocytů bez změn v jejich počtu a k rozsáhlé přestavbě ECM kolem nich (Kukacka et al., 2005, Opie et al., 2006). Odlišně hypertrofují komory i vlivem chronické a intermitentní hypoxie, jak je to znázorněno na obrázku (Obrázek 17).



Obrázek 17: Transverzální řez myokardem potkana v normoxii, chronické hypoxii a intermitentní hypoxii. IS – intrentrikulární septum, LV – levá komora, RV – pravá komora, Převzato z Corno et al. (2004).

Zjišťovali jsme efektivitu dávky batimastatu na inhibici MMP zymograficky. Prokázali jsme, že hypoxie zvyšuje a batimastat snižuje lytické zóny na zymografickém gelu v podobě MMP-2 a MMP-9 a jejich proforem (Obrázek 12). To zároveň potvrzuje vlastnost batimastatu jako širokospektrého inhibitoru MMP. Je ovšem nutno zmínit, že při zymografické metodě by mohlo docházet k omezení vazby inhibitoru na molekuly MMP a tudíž nedetekujeme skutečný stav aktivit MMP. Nicméně i přesto jsme zaznamenali změny, a to jenom dokladuje skutečnost, že batimastat podávaný v experimentu vyvolal i změny v expresi, sekreci a degradaci metaloproteináz. Naši domněnku podporují i některé práce, které dokladují pozitivní korelaci mezi zymografickou detekcí a analýzou pomocí Western blotu MMP inhibovaných *in vivo* různými typy syntetických inhibitorů (Makela et al., 1999). Zároveň jsme zymografií potvrdili již diskutovaný rozdíl mezi přestavbou tkáně RV a LV. V LV byly zaznamenány skutečně velmi slabé lytické zóny MMP v hypoxických podmínkách za podávání batimastatu. Tento stav kolagenolytické

aktivity by vysvětloval, proč na rozdíl od RV se levá komora v hypoxii za současného podávání batimastatu zvětšovala.

Širokospektré syntetické inhibitory, mezi něž batimastat patří, jsou schopny inhibovat také jiné proteinázy, např. TNF- α konvertující enzym, který může měnit zánětlivou odpověď. Batimastat používaný v našem experimentu inhibuje MMP-1, 2, 3, 7 a 9. Uvádí se, že při orálním podávání se prodlužuje jeho plazmatický poločas a je v tomto případě schopný inhibovat i MMP-12 (Botos et al., 1996, Hidalgo and Eckhardt, 2001a). Širokospektré inhibitory jsou konstruovány primárně pro použití v onkologii, ale v experimentální a klinické kardiologii by bylo vhodnější používat vysoce selektivní inhibitory pro jednotlivé MMP tak, jak se uplatňují v remodelaci srdeční tkáně v různých patologických procesech. Problematické je i to, že MMP se uplatňují v normálních procesech remodelace mnoha tkání a dlouhodobá inhibice těchto enzymů by mohla narušit strukturu a funkci jiných tkání.

Časový profil aktivace matrixových metaloproteináz byl dokumentován na řadě experimentálních modelů srdečního selhání a u různých druhů laboratorních zvířat a to jak pomocí stanovení genové exprese, tak pomocí měření aktivity zymografií (Cleutjens, 1996, Kukacka et al., 2005). Je velmi pravděpodobné, že různé podněty mohou v myokardu indukovat různá spektra genové exprese MMP. Například vznik objemového přetížení srdce (vedoucí až k mitrální regurgitaci) je spojen s nárůstem MMP-3. Naopak tlakové přetížení vedoucí ke stenóze aorty nebylo doprovázeno nárůstem MMP-3. Různé příčiny přetížení mohou proto vyvolávat odlišné změny v expresi metaloproteináz, které následně určují remodelaci komory (Spinale et al., 2000a, Spinale et al., 2000b). Jedním z možných vysvětlení zvýšené aktivity MMP je ztráta endogenní inhibice. Relativně novým objevem je pozorovaný nárůst hladin MMP bez korespondujícího signifikantního zvýšení mRNA (Li et al., 2000b), což se potvrdilo i v experimentu s 4denní hypoxií (Kukacka et al., 2007a).

Přestavba srdeční tkáně po chronické tlakové nebo objemové zátěži ve výsledku vytvoří tkáň morfologicky odlišnou, ale ta nemůže být plnohodnotná s původní tkání, ztrácí především svoji vlastnost kontraktility. Reorganizace tkáně znamená zvýšení syntézy složek ECM. Inhibicí MMP omezíme první fázi přestavby tkáně, kdy tyto enzymy rozrušují původní struktury tak, aby mohly být v dalších fázích vytvořeny struktury nové. Snížení syntézy rozpustných proteinů ECM na úkor zvýšení koncentrace nerozpustných proteinů ECM bylo pozorováno v obou komorách. Nově syntetizovaných složek (bez

„cross-links“ elementů) ubylo nebo zřejmě dochází k jejich intenzivnější maturaci (vznik „cross-links“ elementů) a zapojení do vytvářených struktur extracelulární hmoty, která obklopuje myocyty, a nedochází k jejich nežádoucí akumulaci, jak je to známo i u jiných kardiomyopatií (Spinale et al., 1991, Rohde et al., 1999, Creemers et al., 2001, Baicu et al., 2003). S tímto koresponduje i koncentrace kolagenních proteinů jako majoritních složek ECM myokardu. Právě úloha fibrózy a tedy i přítomnost kolagenů s „cross-links“ nebo kolagenů bez „cross-links“ v komorové remodelaci je stále kontroverzní. Intersticiální změny během remodelace srdeční tkáně jsou pravděpodobně více spojené se zvýšenou aktivitou MMP a poklesem kolagenů s „cross-links“ elementy (Badenhorst et al., 2003). Tyto změny jsou považovány za zásadní k náchylnosti kolagenní matrix k degradaci pomocí MMP a k současnému rozvolnění myocytů. Možnou limitací naší studie by mohla být nepřímá analýza koncentrace kolagenu a množství proteinů ECM, avšak obě tyto metody jsou běžně užívané a respektované (Stegemann and Stalder, 1967, Pelouch et al., 1995, Badenhorst et al., 2003).

5.3. DLOUHODOBÁ APLIKACE METAMFETAMINU

Přestože je metamfetamin známá a návyková látka, jejíž rozšíření v posledních 20 letech celosvětově vzrostlo, je zarážející, že existuje jen několik experimentálních nebo klinických prací, které se zabývají zdravotními dopady spojenými s jeho užíváním. Přitom je známo, že kromě postižení CNS, vyvolává MA celou řadu dalších komplikací, které zahrnují neurologické, gynekologické, gastrointestinální, renální, endokrinní a především kardiovaskulární poruchy, které jsou u dlouhodobých uživatelů hlavní příčinou úmrtí. (Yu et al., 2003). Naše experimentální práce vycházela z publikovaných poznatků o uživatelích metamfetaminu, kteří zemřeli většinou na kardiovaskulární komplikace. U nich jsme v autoptických vzorcích myokardu a cév analyzovali abnormální změny v ECM (Vajtr et al., 2002).

Většina prací se při sledování kardiovaskulárních komplikací spojených s dlouhodobým užíváním MA opírá o klinické poznatky nebo analýzu autoptických materiálů. MA vyvolává mnoho kardiovaskulárních problémů, mezi něž patří zvýšený srdeční tep, arytmie, zvýšený krevní tlak a nevratné změny v mozkových cévách, vedoucí k iktusu (Varner et al., 2002). Intravenózní podávání MA u krys způsobilo změnu krevního tlaku, která se skládala z počátečního rychlého zvýšení a bifázické změny srdečního tepu sestávající z bradykardie a následovanou tachykardií (Varner et al., 2002). Předávkování MA indukovalo tachykardii, atrioventrikulární arytmie, ischemii myokardu a akutní hypertenzi (Derlet and Horowitz, 1995). Chronické užívání MA vede u lidí k zánětu srdečních obalů, k buněčné infiltraci, hypertrofii myokardu, fibróze, až k ruptuře myokardu (Yu et al., 2003). U potkana bylo možno po dlouhodobém užívání MA pozorovat degeneraci myocytů, nekrózu, myocytolýzu, kontrakční pásy, atrofované myocyty, fibrózu, ztrátu myoglobinu a dysfunkci mitochondrií v myokardu (Kaiho and Ishiyama, 1989, He et al., 1996).

U chronických uživatelů dochází ke změnám hemodynamických parametrů srdeční funkce. U myši dochází, vzhledem k těmto změnám, k poklesu kontraktility LV a zvětšení LV (Yu et al., 2002). Hypertrofie LV je nacházena i u lidských autoptických vzorků (Yu et al., 2003). Z našich výsledků vyplývá, že chronické podávání metamfetaminu po dobu 9 týdnů v dávce 1 mg/kg/den sice způsobí hmotnostní retardaci u laboratorního potkana,

ale nevyvolá hypertrofii levé ani pravé komory. Také He aj. podávali potkanovi stejnou dávku MA po dobu 56 dnů, nenašli však žádné rozdíly mezi hmotnostmi srdce ani tloušťkou stěn RV či LV u kontrol a pokusných zvířat (He et al., 1996). Větší dávky metamfetaminu zřejmě ke změnám hmotnostních parametrů vedou, jak se nám to podařilo prokázat v jiném experimentu, kdy MA byl potkanovi podáván po dobu 1 měsíce v dávce 5 mg/kg/den (Kukacka et al., 2007b). Pokles hmotnosti je však zcela v souladu s dalšími vlastnostmi MA, tedy jako účinného anorektika (Yu et al., 2003). Metamfetamin může mít na vznik hypertrofie komor i přímý efekt, jak to bylo prokázáno na experimentu s kardiomyocyty v tkáňové kultuře. Ty sice po expozici MA ($0,5 - 1 \text{ mmol.dm}^{-3}$) v kultivačním médiu prvních 7 dnů ztratily schopnost buněčného propojování a prodlužování, ale po přenesení do normálního média a inkubaci po dobu 6 dnů a opětovnému vystavení MA ($0,05 - 0,1 \text{ mmol.dm}^{-3}$) došlo ke zvětšení průřezu buněk s bohatším množstvím aktinových vláken (Maeno et al., 2000a). U uživatelů MA a u experimentálních zvířecích modelů s administrací MA bude mít na rozvoj hypertrofie myokardu zřejmě vliv přímé i nepřímé působení MA.

Další mírné změny v srdeční tkáni (vakuolizace pericytů nebo perivaskulární zásoba makrofágů) je však možno pozorovat na buněčné úrovni. Vzhledem k tomu, že nebyla prokázána perivaskulární ani intersticiální fibróza v komorové tkáni pokusných zvířat, ani vyšší koncentrace hydroxyprolinu, předpokládáme, že k remodelaci srdeční tkáně nedochází. V levé komoře pokusných zvířat byla naopak zjištěna nižší koncentrace hydroxyprolinu, což by mohla být známka počínající dilatace levé komory, jak je to dokumentováno u kardiomyopatií vyvolaných dlouhodobým užíváním metamfetaminu. Z elektroforetické analýzy srdečních kolagenů však vyplynuly i některé kvantitativní změny v zastoupení kolagenů. Přibýlo kolagenu typu III (kolagenu, který je zodpovědný za větší elasticitu srdeční tkáně). Tento kolagen tvoří v normální srdeční tkáni přibližně 11 % ECM (Weber, 1989). Jeho množství se snižuje s věkem, naopak vzrůstá množství kolagenu typu I. Jak již bylo uvedeno, změna poměru obou majoritních kolagenů není spojena pouze se stárnutím srdeční tkáně, ale také s procesy remodelace, tedy především zvýšení koncentrace kolagenu typu III je spojeno s dilatací srdeční tkáně (D'Armiento, 2002). Také pacienti s ischemickou kardiomyopatií mají signifikantně vyšší koncentraci kolagenu typu III, ale ke změnám celkového množství kolagenu ve tkáni nedochází, což potvrzuje význam změn v zastoupení jednotlivých typů kolagenu pro funkci srdeční tkáně (Mukherjee and Sen, 1991). Z našich výsledků není možné usoudit,

zda-li by mohl mít MA přímý vliv na syntézu kolagenních proteinů, jako je tomu např. u jiných látek nebo již zde diskutované hypoxie.

Případné změny v ECM srdeční tkáně potkanů, kterým byl aplikován metamfetamin, nebyly doprovázeny změnami v zymografické aktivitě matrixových metaloproteináz. Přitom při analýze autoptických vzorků srdeční tkáně dlouhodobých uživatelů metamfetaminu jsme zjistili zvýšenou aktivitu matrixových metaloproteináz na želatině, především MMP-9. Na druhé straně u krátkodobých uživatelů nebyly změny zaznamenány (Vajtr et al., 2002). MA potencuje uvolnění katecholaminových neurotransmiterů (norepinefrinu a dopaminu) na presynaptických nervových zakončeních. MA inhibuje zpětné vychytávání neurotransmiterů a brání jejich degradaci inhibicí monoaminoxidázy (Wagner et al., 1979, Wagner et al., 1980). MA nestimuluje postsynaptické receptory pro katecholaminy přímo. Zvýšené množství katecholaminů je zodpovědné za kardiotoxicitu díky koronární vasokonstrikci, vysokému přísunu vápníku a produkcí ROS autooxidací katecholaminů a jejich degradací monoaminoxidázou (Wagner et al., 1980). Abnormální hladiny katecholaminů indukují hypertrofii, infarkt a kardiomegalii (Furst et al., 1990, Islam et al., 1995, Maeno et al., 2000a, Maeno et al., 2000b). V literatuře jsou jen ojedinělá data, která by se týkala vztahu remodelace srdeční tkáně a aktivity MMP po aplikaci metamfetaminu. Briest aj. zjistili, že dlouhodobá aplikace norepinefrinu u krys způsobuje hypertrofii LV a fibrózu a zároveň zvyšuje aktivitu MMP-2 v srdeční tkáni (Briest et al., 2001, Briest et al., 2003). Tedy souhrnně, nadprodukce katecholaminů vlivem MA je významným faktorem, který vede k poškození srdce.

Kromě dávky metamfetaminu je důležité i zastoupení jednotlivých stereoizomerů MA. D-forma MA je přibližně 5x biologicky aktivnější než L-forma. Většina studií používá směs obou izomerů nebo se o zastoupení izoformů vůbec nezmiňuje (Yu et al., 2003).

Metamfetamin je také významným zdrojem ROS, které jsou příčinou především neurotoxicity. Je však možno uvažovat i o možném poškození kardiovaskulárního systému, především vznikem produktů autooxidace katecholaminů (Wagner et al., 1980). Je známo, že metalothionein produkovaný v CNS je potentní scavenger ROS, které zde vznikají jako následek metamfetaminem indukované toxicity (Ajijmaporn et al., 2005). V naší studii jsme našli sérovou koncentraci MT u potkanů po aplikaci MA 4,15krát vyšší než u kontrol, což svědčí o systémové produkci této molekuly. Oxidačnímu stresu jsou zřejmě vystaveny i jiné tkáně než srdeční nebo tkáně CNS.

Je možno uzavřít, že po podání MA dochází pouze k určitým změnám proteinového složení myokardu, zvláště levé komory, ale k výraznému kardiovaskulárnímu poškození nikoliv. Použitá dávka a délka užívání metamfetaminu v našem experimentu vyvolala jen diskrétní změny a nezpůsobila výraznou remodelaci srdeční tkáně.

5.4. PACIENTI S PORUCHOU LIPIDOVÉHO METABOLIZMU

Náš soubor dyslipidemických pacientů měl koncentraci cholesterolu o 36 % vyšší než soubor kontrolních zdravých jedinců. Dietní tříměsíční opatření vedly k poklesu o 2,4 %, ale farmakoterapií o 17 %. K farmakoterapii byli indikováni pacienti, jejichž průměrná koncentrace celkového cholesterolu v séru byla $7,17 \pm 0,28$ mmol/l. Benefit hypolipidemické léčby spočívá navíc pravděpodobně v odstranění akumulace makrofágů v aterosklerotických plátech s následnou inhibicí aktivity matrixových metaloproteináz. K monitorování tohoto procesu by bylo vhodné stanovení sérových MMP v průběhu terapie. Současná klinická praxe však zatím sledování MMP nepoužívá.

Metoda zymografie byla zvolena jako vhodné doplnění stanovení aktivity želatináz (MMP-2 a MMP-9). Zároveň je to určitá confirmace stanovení koncentrace MMP pomocí komerční imunosorbentní metody, kdy je detekována celková koncentrace, ale nesleduje se ani aktivita latentních a aktivních forem jednotlivých želatináz ani rozdíly aktivit po terapeutickém zásahu nebo mezi kontrolními vzorky a pacienty s dyslipoproteinemií. Jak vyplývá z našich výsledků, terapie hypolipidemiky mění aktivitu jednotlivých lytických zón, tedy aktivitu latentních a aktivních forem, i když celková zymografická aktivita se nemění. Domníváme se, že jedním z mechanismů by mohl být přímý inhibiční účinek statinů na některé MMP. Některá hypolipidemika, jako jsou statiny, inhibují aktivitu MMP. Statiny jsou inhibitory 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA-reduktázy), klíčového enzymu syntézy cholesterolu. Používání tohoto inhibitoru se uplatnilo v léčbě mnoha kardiovaskulárních a cerebrálních onemocnění. Statiny mají velmi dobré léčebné účinky, které vyplývají z těchto pleiotropních efektů: nejznámější je jejich schopnost snižovat koncentrace lipidů, dále efekt na interakci buňka-buňka v cévách a ovlivňování syntézy MMP a proteolytické aktivity těchto enzymů. Některé studie u hyperlipidemických pacientů léčených fluvastatinem po infarktu myokardu ukázaly snížení rizika následného výskytu ischemické choroby mozkové o 32 % (Ballantyne et al., 1999). Literární údaje potvrzují mnoho funkcí statinů: hypolipidemický a protizánětlivý efekt, ale také modulující efekt na rozvoj aterosklerotických lézí. *In vitro* statiny snižují adhezi monocytů na endotelové molekuly. Simvastatin, fluvastatin, cerivastatin a pravastatin brzdí migraci a proliferaci buněk hladkého svalstva a zároveň inhibují produkci MMP-9 makrofágy (Loftus

and Thompson, 2002). U hypercholesterolemických pacientů s onemocněním koronárních cév léčených pitavastatinem došlo k výraznému snížení exprese MMP-3 a MMP-9 (Beaudeau et al., 2004). Statiny tedy zřejmě inhibují MMP na lipidech nezávislou cestou.

V práci jsme stanovili hladiny cirkulujících matrixových metaloproteináz MMP-3 a MMP-9 v séru zdravých osob. Referenční meze MMP v séru zdravých osob nejsou dostatečně známy. Naše práce se pokouší k této problematice přispět. Znalost referenčních mezí by mohla být zásadní pro aplikaci do rutinní klinicko-biochemické diagnostiky. Koncentrace MMP-3 v našem souboru 40 zdravých osob byla $7,52 \pm 0,71$ $\mu\text{g/l}$. Hodnota je mírně nižší, než se uvádí v jiných pracích, které stanovovaly sérovou hladinu v souborech zahrnujících menší počet pacientů nebo jinou než středoevropskou populaci nebo byl použit jiný diagnostický kit (Koh et al., 2004, Malik et al., 2005, El Messal et al., 2006). Ještě problematičtější je stanovení referenčních mezí u MMP-9. V dostupné literatuře se různé průměrné hodnoty kontrolních souborů pohybovaly od 5,8 do 69 $\mu\text{g/l}$. Převažují však hodnoty kolem 20 $\mu\text{g/l}$ a ty potvrzuje i námi naměřená hodnota u 40 zdravých jedinců, která činila $16,33 \pm 1,72$ $\mu\text{g/l}$.

Zvýšené koncentrace cirkulující MMP-9 v séru až o několik desítek procent jsou známy především u různých nádorových onemocnění, kde zároveň dochází ke zvýšené expresi jejich přirozených inhibitorů a tedy i k vyšší koncentraci cirkulujících komplexů MMP/TIMP, což je nutno zohlednit při volbě laboratorní metody pro jejich stanovení (Zucker et al., 1999). Vyšší hladiny cirkulující MMP-9 nacházíme i u pacientů s DLP, což se potvrdilo i v této práci, kde celková aktivita MMP-9 u pacientů s DLP byla o 125 % vyšší než u kontrolního souboru. Jak ukazují některé studie, MMP-9 je nezávislý prognostický rizikový faktor u pacientů s ICHS (Kalela et al., 2002, Blankenberg et al., 2003). Prokázali jsme pokles aktivity MMP-9 po třech měsících léčby dietním režimem o 17 %, v případě tříměsíční farmakoterapie o 28,6 %. Koncentrace MMP-3 po 3 měsících sice klesla v případě dietního režimu až o 35 %, ale pokles nebyl statisticky významný. MMP-3 je také považována za marker nestability aterosklerotických plátů. Byla publikována práce, kde byla sledována aktivita MMP-3 po terapii hypolipidemiky a např. u pacientů s izolovanou hypercholesterolemií léčených 10 týdnů atorvastatinem 20 mg/den klesla MMP-3 o 58 % (Malik et al., 2005).

Matrixové metaloproteinázy MMP-3 a MMP-9 se ukazují jako velmi vhodné markery ICHS. Z této práce vyplývá, že by se mohly také uplatnit v monitorování

úspěšnosti hypolipidemické terapie. Na hladiny sérových metaloproteináz měla vliv jak farmakoterapie, tak dietní opatření.

5.5. SOUBOR PACIENTŮ S TRAUMATICKÝM POŠKOZENÍM MOZKU

Traumatické poškození mozku je jednak výsledkem jeho mechanického poškození, jednak také nepřímých (sekundárních) mechanismů (Ray et al., 2002). Mozková tkáň, která obklopuje poškozené místo (traumatická penumbra), je dějištěm reparativních procesů, ale také sekundárního mozkového poškození, které může vznikat po několika hodinách až dnech. Mechanismus poškození po TBI není zcela dobře prostudován, poslední studie ale ukázaly, že se zde uplatňuje imunitní odpověď a aktivace neutrofilů (Vlodavsky et al., 2005, Vlodavsky et al., 2006). Je možné říci, že akutní zánětlivá odpověď v oblasti traumatické penumbry, která je podstatná pro reparační proces, může vést zároveň k poškození mozkové tkáně a hraje důležitou roli v potraumatickém procesu sekundární neuronální smrti (Danton and Dietrich, 2003).

V posledních letech se objevilo několik prací, které potvrdily klíčovou roli mezi matrixovými metaloproteinázami a vznikem poškození mozkové tkáně při TBI. Tyto práce se především opírají o experimentální modely TBI (Wang et al., 2002b, Mun-Bryce et al., 2004). Prací z klinické oblasti, které by nějakým způsobem dokumentovaly vztah mezi sérovými koncentracemi MMP a stupněm poškození nebo prognózou jeho vývoje, je málo.

Produkce matrixových metaloproteináz, zvláště pak MMP-2 a MMP-9, je deregulována v různých typech mozkového poškození – ischemického s reperfuzí, hemoragického poškození a traumatického poškození (Mori et al., 2002, Wang et al., 2002b, Mun-Bryce et al., 2004). Tkáňové inhibitory MMP jsou exprimovány v průběhu procesů následujících TBI a především v zánětlivé odpovědi na něj. Mechanismus aktivace MMP *in vivo* není zcela objasněn, zvláště pak nejsou objasněny různé buněčné zdroje MMP, které se zde významně uplatňují. Přesto v souladu s různými autory je možno o úloze MMP v TBI konstatovat:

- Mediátory zánětlivé reakce, jako je TNF- α a interleukin-1 β , jsou produkovány při TBI a indukují sekreci MMP mozkovými buňkami (Lo et al., 2002).
- Po vzniku TBI je influx zánětlivých buněk hlavním zdrojem aktivity MMP (Cuzner and Opdenakker, 1999)

- MMP v poškozeném mozku hrají zápornou roli a způsobují buněčnou smrt v procesu apoptózy (Lo et al., 2002).

MMP-9 byla studována zejména v souvislosti s hemoragickou transformací ischemického ložiska mozkové tkáně (Castellanos et al., 2003). U našich pacientů byly zjištěny vyšší hladiny MMP-9 ve skupině kontuzí s expanzním chováním, nárůstem nitrolebního tlaku nad 10 torr a posunem střední čáry mozku o více než 5 mm v prvních 3 dnech po přijetí. U pacientů po operaci expanzní kontuze byly hladiny MMP-9 mezi 4.-8. dnem nižší než u pacientů bez operace se stacionárním nálezem a s postupným dobarvováním kontuze v CT obraze. MMP-9 a další markery vysoce korelují s ischemickým poškozením (Lynch et al., 2004, Lynch and Laskowitz, 2004). Lokální hypoxicko-ischemický inzult může zhoršovat kontuzi mozku, respektive vést k hemoragické transformaci (Horstmann et al., 2003, Harris et al., 2005). Ve skupině našich pacientů bez operace a bez známek expanzní kontuze bylo prokázáno zvýšení MMP-9 na 232,6 µg/l 4.-8. den oproti hodnotám 1.-3. dne. Tyto hodnoty jsou zhruba 14x vyšší než u zdravých jedinců (viz kapitola 4.4.3). Je zřejmé, že po TBI dochází k masivnímu vyplavování MMP-9 do krevního oběhu. Také jiné práce potvrzují zvýšené hladiny MMP-9 po traumatu, vyšší koncentrace byly zjištěny ve venózní krvi v jugulárním bulbu než v arteriální krvi (Suehiro et al., 2004). Naše vzorky byly získány odběrem venózní krve z centrálního žilního katetru.

Samotné ischemické postižení mozku po traumatu bývá velmi často příčinou zhoršení klinického stavu pacientů, může vyústit až do smrti mozku. Hypoxie potencuje expanzní chování kontuzního ložiska a zvětšení kolaterálního edému, nárůst nitrolebního tlaku. Hypoxie vzniká často v souvislosti s aspirací žaludečního obsahu do dýchacích cest a při poranění hrudníku. Hypotenze v souvislosti s těžkým úrazem hlavy zdvojnásobuje mortalitu pacientů (Chesnut et al., 1993). Monitorování hypoxie a jejího vlivu na kontuzní poranění mozku je důležité z hlediska prognózy pacienta. Navíc léčba hypoxie pomocí hyperbarické kyslíkové terapie (HBOT) v klinické praxi se stává velmi nadějnou metodou, jak redukovat sekundární poškození mozku po TBI. HBOT má neuroprotektivní efekt u různých typů poškození mozku (Tinianow et al., 2000, Vlodavsky et al., 2006). I když není zcela objasněn benefitní mechanismus HBOT, existují práce, které dokladují souvislost mezi HBOT a modulací exprese MMP-9 a TIMP v traumatickém ložisku (Mun-Bryce et al., 2004, Vlodavsky et al., 2006).

Referenční hodnoty pro MMP-2 jsou uváděny v intervalu 427 – 835 $\mu\text{g/l}$ (Montaner et al., 2001). U skupiny pacientů s horší prognózou byly nalezeny vyšší hodnoty. Stejně jako o MMP-9 se o MMP-2 uvažuje jako o jednom z hlavních aktérů narušení hematoencefalické bariéry po poškození mozku. Mezi oběma želatinázami je však značný rozdíl, což je patrné i z našich výsledků. MMP-9 je vysoce inducibilní molekula a změna její aktivity v CNS vlivem různých patologických faktorů bývá 5x až 6x vyšší v porovnání s MMP-2 (Haorah et al., 2007). To nasvědčuje tomu, že v CNS se MMP-2 vyskytuje většinou v konstitutivní formě. MMP-9 v porovnání s MMP-2 se také selektivněji podílí na otevření BBB během zánětu nebo neurodegenerace (Vos et al., 2000, Mun-Bryce et al., 2004) nebo ischemické příhody mozkové (Kouwenhoven et al., 2001). Konstitutivní exprese latentní MMP-2 je výhodný zdroj proteolytické aktivity bezprostředně po poškození tkáně, později se zřejmě uplatňují jiné MMP, zvláště pak MMP-9. MMP-9 zároveň způsobuje extenzivnější poškození s dlouhodobějším trváním, které není omezeno jen na okolí buněčného povrchu. Navíc všechny potřebné faktory přispívající k aktivaci MMP-2 jsou bezprostředně přítomny v mozkové tkáni. Jsou to např. membránové MMP (Yang et al., 2007). Z našich výsledků a v souladu s těmito fakty tedy vyplývá, že stanovení MMP-9 je výhodnější pro prognózu TBI, popřípadě monitorování jeho vývoje a následků.

Je známo, že syntéza metalothioneinu, zvláště MT-1 a MT-2, je dramaticky indukována po různých typech poškození mozkové tkáně. Jeho ochranný efekt v CNS je spíše přisuzován antioxidantním vlastnostem než jeho vazebné kapacitě pro zinek (Hidalgo et al., 2001). Isoformy MT-1 a MT-2 urychlují regeneraci poškozeného parenchymu, zvyšují angiogenezi, potlačují symptomy oxidativního stresu a potlačují apoptózu (Penkowa et al., 1999, Penkowa, 2006). V našem souboru hodnoty MT u obou skupin pacientů vzrostly. U skupiny I (GCS=15) vzrostly na průměrnou 1,462 $\mu\text{mol/l}$ během 1.-3. dne a u skupiny II (GCS<15) na hodnotu 1,423 $\mu\text{mol/l}$ v průběhu 4.-8. dne. Naše výsledky nemůžeme porovnat s jinými daty. Ačkoliv existuje velký počet literárních údajů o změnách koncentrací MT po poranění mozku u experimentálních zvířat, nikdo se zatím nezabýval stanovením koncentrace MT v krvi pacientů s TBI. V diagnostice kranioencefalického poranění se rutinně používají neuronspecifická enoláza (NSE) a protein S100B. Tyto markery jsou považovány za specifické indikátory poškození gliové (S100B) nebo neuronální (NSE) tkáně mozku (Vajtr et al., 2006, Vajtr et al., 2007). Jak jsme již ukázali v jiné práci, NSE a S100B s hodnotami MT nekoreluje, a MT tak může být

nezávislým diagnostickým a prognostickým markerem TBI (Kukacka et al., 2006b). Nejvyšší hodnoty MT 3,305 $\mu\text{mol/l}$ byly zaznamenány u pacienta s difúzním-axonálním poraněním 4. den po poranění. Takto vysoké hodnoty poukazují na to, že by MT mohl být v klinické praxi částečně využíván pro diagnostiku difúzního-axonálního poranění. Protože se statisticky lišily hodnoty MT u skupiny s horší prognózou a GCS od skupiny s lepší prognózou a GCS 1.-3. den po TBI i 4.-8. den po TBI, mohlo by být monitorování MT vhodným nástrojem k posouzení rozsahu poranění nebo trvání bezvědomí.

6. Závěr

1. *Analyzovali jsme matrixové metaloproteinázy, metalothionein a proteinové složení srdečního svalu laboratorního potkana v různých patologických situacích.*

Zjistili jsme, že 4denní hypoxie a 4denní hypoxie s hyperkapnií navozují remodelaci myokardu laboratorního potkana, dochází ke změnám na úrovni koncentrací proteinů extracelulární matrix, ke změnám v expresi jednotlivých typů kolagenů, matrixových metaloproteináz i jejich inhibitorů.

Prokázali jsme, že 3týdenní izobarická hypoxie způsobuje remodelaci myokardu laboratorního potkana. Tuto remodelaci významně snižoval prostřednictvím inhibice matrixových metaloproteináz jejich syntetický inhibitor-batimastat.

Studovali jsme vliv podávání metamfetaminu u laboratorního potkana na remodelaci myokardu, aktivitu matrixových metaloproteináz a koncentraci metalothioneinu, který by mohl být v klinické praxi využíván k monitorování toxického poškození uživatelů metamfetaminu.

2. *Zavedli jsme metodiku pro identifikaci a kvantifikaci matrixových metaloproteináz a metalothioneinu v biologických tekutinách.*

Stanovili jsme koncentraci sérových matrixových metaloproteináz u pacientů s dyslipoproteinémií a posoudili, jak jsou ovlivněny farmakoterapií a dietním režimem. Matrixové metaloproteinázy MMP-3 a MMP-9 se ukazují jako vhodné časné markery ischemické choroby srdeční a z této práce vyplývá, že by se mohly také uplatnit v monitorování úspěšnosti hypolipidemické terapie.

Vyšetřili jsme sérovou koncentraci matrixových metaloproteináz a metalothioneinu u pacientů s traumatickým poškozením mozku a posoudili vhodnost těchto markerů pro určení diagnózy a prognózy onemocnění. Metalothionein by mohl být v klinické praxi částečně využíván pro diagnostiku difuzního-axonálního poranění. Rutinní zavedení stanovení koncentrací cirkulující MMP-9 by mohlo být vhodné pro prognózu traumatického poškození mozku, popřípadě monitorování jeho vývoje a následků.

7. Souhrn

Úvod: Matrixové metaloproteinázy (MMP) jsou metaloproteiny obsahující zinek, které se účastní řady procesů spojených s remodelací extracelulární matrix (ECM). Tyto enzymy se účastní většiny procesů, které degradují pojivovou tkáň v průběhu ontogenetického vývoje, ale jejich změněnou expresi a aktivitu pozorujeme také ve většině zánětlivých, degenerativních a maligních procesech. Do skupiny metaloproteinů spojených se zinkem patří i metalothionein (MT), který se uplatňuje v transportu kovů, detoxikačních mechanismech a ochraně buněk před poškozením reaktivními částicemi.

Cíl: Cílem této práce bylo analyzovat MMP a metalothionein v různých experimentálních modelech remodelace srdeční tkáně (v podmínkách hypoxie a vlivem podávání metamfetaminu) a v souborech pacientů s poruchou lipidového metabolismu nebo s traumatickým poškozením mozku.

Metody: Laboratorní potkan byl vystaven 1) hypoxii 3 týdny za současného podávání inhibitoru MMP, 2) hypoxii a hypoxii-hyperkapnií po dobu 4 dnů. 3) V jiném experimentu byl laboratornímu potkanovi aplikován metamfetamin. 4) Dále byl vyšetřen soubor pacientů s dyslipidemií před zahájením léčby a 1 měsíc po léčbě hypolipidemiky a dietním opatřením. 5) Vzorky krve byly získány od souboru pacientů s traumatickým poškozením mozku v průběhu hospitalizace. MMP byly analyzovány metodou zymografie, imunochemickou metodou i analýzou mRNA. Metalothionein byl stanoven elektrochemickou metodou. Dále byla provedena v experimentálních modelech proteinová frakcionace srdeční tkáně, analýza proteinů extracelulární matrix a jednotlivých kolagenů. V souboru dyslipidemických pacientů byly vyšetřeny základní biochemické parametry lipidového spektra.

Výsledky: Chronická 4denní hypoxie a hypoxie s hyperkapnií indukovala změny hmotnostních parametrů srdce, proteinové kompozice srdeční extracelulární matrix, koncentrace kolagenů a genové exprese kolagenů, změny v expresi a aktivitě matrixových metaloproteináz. 3týdenní hypoxie vedla k hypertrofii komor, podáváním inhibitoru MMP došlo ke zmírnění hypertrofie, inhibici MMP detekované zymograficky a ke změnám koncentrací rozpustných a nerozpustných složek ECM. Podávání metamfetaminu laboratornímu potkanovi nevyvolalo komorovou hypertrofii, nemělo vliv na aktivitu MMP, ale vyvolalo některé změny v koncentraci kolagenních molekul a zvýšilo

koncentrací MT v séru. Pacienti s dyslipoproteinémií měli statisticky vyšší koncentraci MMP-9 a farmakoterapií došlo k jejímu snížení. U skupiny pacientů se závažnějším traumatickým poškozením mozku došlo ke zvýšení koncentrace MT v průběhu osmidenní hospitalizace. 1.-3. den po poranění byly koncentrace MMP-2 a MMP-9 vyšší u skupiny pacientů se závažnějším poškozením mozku, 4.-8. den již rozdíly nebyly tak významné.

Závěr: Zjistili jsme, že matrixové metaloproteinázy se významně podílejí na remodelaci srdeční tkáně vlivem různých experimentálních podmínek a jejich inhibice pomocí inhibitorů jako je batimastat by mohla pomoci v léčbě některých kardiomyopatií. Některé MMP mohou být vhodnými markery subklinické aterosklerózy a úspěšnosti hypolipidemické léčby. Metalothionein, MMP-2 a MMP-9 by mohly být vhodným nástrojem k posouzení stupně traumatického poškození mozku a jeho dalšího vývoje, trvání bezvědomí a částečně k diagnóze difuzního-axonálního poškození.

8. Summary

Introduction: Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-containing metalloproteins which take part in many processes associated with extracellular matrix (ECM) remodeling. These enzymes participate in most processes degrading connective tissue during ontogenesis. Changes in MMP expression and activity can be observed in most inflammatory, degenerative, and malign processes. Methallothionein also belongs to the group of zinc-dependent metalloproteins and it is involved in metal trafficking, detoxification or protection of cells against reactive oxygen species.

Aim: The aim of this study was to analyze MMP and methallothionein in various experimental models of cardiac tissue remodeling (under hypoxia and methamphetamine administration) and in groups of patients with dyslipoproteinemia and traumatic brain injury.

Methods: Laboratory rats were exposed to 1) hypoxia for 3 weeks and treated with MMP inhibitor 2) hypoxia and hypoxic hypercapnia for 4 days. 3) In another experimental set methamphetamine was applied to rats for 9 weeks. 4) A group of patients with dyslipoproteinemia was investigated before and after 1 month therapy by diet or hypolipidemics. 5) Blood samples were collected from patients with traumatic brain injury during hospitalization. MMPs were analysed by zymography, immunochemical method, and mRNA analysis. Methallothionein was determined by electrochemical method. Furthermore, protein profiling of cardiac tissue was performed in experimental animals, analysis of ECM proteins or individual collagens. Basic biochemical parameters of lipid metabolism were investigated in patients with dyslipoproteinemia.

Results: Chronic 4-days hypoxia and hypoxic hypercapnia induced changes in weights of hearts, protein composition of cardiac ECM, collagen concentration and collagen genes expression, and changes of MMPs expression and activity. 3 weeks hypoxia lead to ventricular hypertrophy which was moderated by MMPs inhibitor – batimastat. Batimastat decreased zymographic activity of MMPs and involved changes in concentration of soluble and insoluble ECM proteins. Methamphetamine administration in rats was not associated with ventricular hypertrophy or changes in MMPs activity, but it induced changes in collagen concentration and it increased serum levels of methallothionein. We found higher levels of circulating MMP-9 in patients with dyslipoproteinemia. This levels decreased after pharmacotherapy. Concentration of methallothionein was elevated in patients with major traumatic brain injury during 8 days

of hospitalization. 1-3 days after injury MMP-2 and MMP-9 concentrations were higher in group of patients with major injury, next 4-8 days any differences in MMPs concentrations were observed.

Conclusions: We found that matrix metalloproteinases play an important role in cardiac tissue remodeling involved in various experimental conditions and that their pharmacological inhibition could be promising therapy of some cardiomyopathies. Some MMPs can stand as candidate biochemical markers of subclinical atherosclerosis or to monitor hypolipidemic therapy. A monitoring the content of metallothionein and some MMPs in patients with traumatic brain injury would be a suitable approach to evaluate the degree of injury or duration of prolonging unconsciousness, particularly in diagnosis of diffuse axonal injury.

9. Literatura

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106: 3143-3421.
2. Abdel-Mageed, A. and Agrawal, K. C. Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*. 1997; 4: 199-207.
3. Abdel-Mageed, A. B. and Agrawal, K. C. Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res*. 1998; 58: 2335-2338.
4. Adnot, S., Raffestin, B., Eddahibi, S., Braquet, P. and Chabrier, P. E. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest*. 1991; 87: 155-162.
5. Aimes, R. T. and Quigley, J. P. 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- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 1995; 270: 5872-5876.
6. Ajjimaporn, A., Swinscoe, J., Shavali, S., Govitrapong, P. and Ebadi, M. Metallothionein provides zinc-mediated protective effects against methamphetamine toxicity in SK-N-SH cells. *Brain Res Bull*. 2005; 67: 466-475.
7. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. and Fu, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974; 20: 470-475.
8. Allan, J. A., Hembry, R. M., Angal, S., Reynolds, J. J. and Murphy, G. Binding of latent and high Mr active forms of stromelysin to collagen is mediated by the C-terminal domain. *J Cell Sci*. 1991; 99: 789-795.
9. Anand-Apte, B., Bao, L., Smith, R., Iwata, K., Olsen, B. R., Zetter, B. and Apte, S. S. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol*. 1996; 74: 853-862.
10. Aniskovitch, L. P. and Jacob, S. T. Distinct rat proteins can recognize CCAAT-homologous sequences of the metallothionein promoter and trans-activate this promoter. *Oncogene*. 1998; 16: 1475-1486.
11. Apte, S. S., Hayashi, K., Seldin, M. F., Mattei, M. G., Hayashi, M. and Olsen, B. R. Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is

- expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10. *Dev Dyn.* 1994; 200: 177-197.
12. Arthur, M. J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: G245-249.
 13. Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T. and Casari, G. Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol.* 2003; 163: 777-787.
 14. Auble, D. T. and Brinckerhoff, C. E. The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. *Biochemistry.* 1991; 30: 4629-4635.
 15. Badenhorst, D., Maseko, M., Tsoetsi, O. J., Naidoo, A., Brooksbank, R., Norton, G. R. and Woodiwiss, A. J. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 632-641.
 16. Baicu, C. F., Stroud, J. D., Livesay, V. A., Hapke, E., Holder, J., Spinale, F. G. and Zile, M. R. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: H122-132.
 17. Ballantyne, C. M., Herd, J. A., Ferlic, L. L., Dunn, J. K., Farmer, J. A., Jones, P. H., Schein, J. R. and Gotto, A. M., Jr. Influence of low HDL on progression of coronary artery disease and response to fluvastatin therapy. *Circulation.* 1999; 99: 736-743.
 18. Barer, G. R., Bee, D. and Wach, R. A. Contribution of polycythaemia to pulmonary hypertension in simulated high altitude in rats. *J Physiol.* 1983; 336: 27-38.
 19. Baudouin, S. V. and Bateman, N. T. Contractility of papillary muscle from rats exposed to 28 days of hypoxia, hypercapnia, and hypoxia with hypercapnia. *Thorax.* 1989; 44: 808-811.
 20. Beaudoux, J. L., Giral, P., Bruckert, E., Bernard, M., Foglietti, M. J. and Chapman, M. J. Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2003; 169: 139-146.
 21. Beaudoux, J. L., Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M. J. and Chapman, M. J. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 121-131.
 22. Belaouaj, A. A., Li, A., Wun, T. C., Welgus, H. G. and Shapiro, S. D. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27123-27128.

23. Beninga, J., Rock, K. L. and Goldberg, A. L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 18734-18742.
24. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7: 728-735.
25. Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H. and Nabeshima, K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 1995; 55: 434-439.
26. Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Poirier, O., Bickel, C., Smieja, M., Hafner, G., Meyer, J., Cambien, F. and Tiret, L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003; 107: 1579-1585.
27. Blumberg, F. C., Lorenz, C., Wolf, K., Sandner, P., Riegger, G. A. and Pfeifer, M. Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 171-177.
28. Bode, W. A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure.* 1995; 3: 527-530.
29. Borkakoti, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med.* 2000; 78: 261-268.
30. Botos, I., Scapozza, L., Zhang, D., Liotta, L. A. and Meyer, E. F. Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 2749-2754.
31. Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L. O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharfetter-Kochanek, K. Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998; 273: 5279-5287.
32. Briest, W., Holzl, A., Rassler, B., Deten, A., Baba, H. A. and Zimmer, H. G. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 379-387.
33. Briest, W., Holzl, A., Rassler, B., Deten, A., Leicht, M., Baba, H. A. and Zimmer, H. G. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res.* 2001; 52: 265-273.
34. Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L. and Benbow, U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4823-4830.

35. Brower, G. L. and Janicki, J. S. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H674-683.
36. Buttner, F. H., Hughes, C. E., Margerie, D., Lichte, A., Tschesche, H., Caterson, B. and Bartnik, E. Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J*. 1998; 333: 159-165.
37. Carlyle, W. C., Jacobson, A. W., Judd, D. L., Tian, B., Chu, C., Hauer, K. M., Hartman, M. M. and McDonald, K. M. Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29: 2451-2463.
38. Castellanos, M., Leira, R., Serena, J., Pumar, J. M., Lizasoain, I., Castillo, J. and Davalos, A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003; 34: 40-46.
39. Cleutjens, J. P. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 816-821.
40. Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F. and Daemen, M. J. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*. 1995; 147: 325-338.
41. Cleutjens, K. B., van Eekelen, C. C., van der Korput, H. A., Brinkmann, A. O. and Trapman, J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem*. 1996; 271: 6379-6388.
42. Clozel, J. P., Saunier, C., Hartemann, D., Allam, M. and Fischli, W. Effects of hypoxia and hypercapnia on atrial natriuretic factor and plasma renin activity in conscious dogs. *Clin Sci (Lond)*. 1989; 76: 249-254.
43. Coker, M. L., Thomas, C. V., Clair, M. J., Hendrick, J. W., Krombach, R. S., Galis, Z. S. and Spinale, F. G. Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. *Am J Physiol*. 1998; 274: H1516-1523.
44. Cousins, R. J., Liuzzi, J. P. and Lichten, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*. 2006; 281: 24085-24089.
45. Creemers, E. E., Cleutjens, J. P., Smits, J. F. and Daemen, M. J. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001; 89: 201-210.
46. Cuzner, M. L. and Opdenakker, G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 1999; 94: 1-14.

47. D'Armiento, J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12: 97-101.
48. Danton, G. H. and Dietrich, W. D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003; 62: 127-136.
49. Datta, P. K. and Jacob, S. T. Activation of the metallothionein-I gene promoter in response to cadmium and USF in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 230: 159-163.
50. De Souza, S. J., Pereira, H. M., Jacchieri, S. and Brentani, R. R. Collagen/collagenase interaction: does the enzyme mimic the conformation of its own substrate? *Faseb J.* 1996; 10: 927-930.
51. Derlet, R. W. and Horowitz, B. Z. Cardiotoxic drugs. *Emerg Med Clin North Am.* 1995; 13: 771-791.
52. Devergnas, S., Chimienti, F., Naud, N., Pennequin, A., Coquerel, Y., Chantegrel, J., Favier, A. and Seve, M. Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 699-709.
53. Dhanaraj, V., Ye, Q. Z., Johnson, L. L., Hupe, D. J., Ortwine, D. F., Dunbar, J. B., Jr., Rubin, J. R., Pavlovsky, A., Humblet, C. and Blundell, T. L. X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure.* 1996; 4: 375-386.
54. Duivenvoorden, W. C., Hirte, H. W. and Singh, G. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17: 27-34.
55. Edland, S. D. Insulin-degrading enzyme, apolipoprotein E, and Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004; 23: 213-217.
56. Eklund, L., Piuhola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fassler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T. E. and Pihlajaniemi, T. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 1194-1199.
57. El Messal, M., Beaudoux, J. L., Drissi, A., Giral, P., Chater, R., Bruckert, E., Adlouni, A. and Chapman, M. J. Elevated serum levels of proinflammatory cytokines and biomarkers of matrix remodeling in never-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta.* 2006; 366: 185-189.
58. Eillerbroek, S. M., Wu, Y. I. and Stack, M. S. Type I collagen stabilization of matrix metalloproteinase-2. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 390: 51-56.

59. Fabunmi, R. P., Baker, A. H., Murray, E. J., Booth, R. F. and Newby, A. C. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 1996; 315: 335-342.
60. Fingleton, B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des.* 2007; 13: 333-346.
61. Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 1996; 379: 335-339.
62. Fossati P, P. L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry.* 1982; 28: 2077.
63. Franchini, M., Gilli, U., Akens, M. K., Fellenberg, R. V. and Bracher, V. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 66: 53-65.
64. Fraústo da Silva, J. J. R. and Williams, R. J. P. The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. 2004. Oxford University Press, Oxford.
65. Furst, S. R., Fallon, S. P., Reznik, G. N. and Shah, P. K. Myocardial infarction after inhalation of methamphetamine. *N Engl J Med.* 1990; 323: 1147-1148.
66. Gaither, L. A. and Eide, D. J. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5560-5564.
67. Gaither, L. A. and Eide, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals.* 2001; 14: 251-270.
68. Galis, Z. S. and Khatri, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002; 90: 251-262.
69. Ghoshal, K., Majumder, S., Li, Z., Bray, T. M. and Jacob, S. T. Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 264: 735-742.
70. Gijbels, K., Proost, P., Masure, S., Carton, H., Billiau, A. and Opdenakker, G. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res.* 1993; 36: 432-440.
71. Golub, L. M., Lee, H. M., Ryan, M. E., Giannobile, W. V., Payne, J. and Sorsa, T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 1998; 12: 12-26.
72. Gomis-Ruth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. and Bode, W. The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 A crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain. *J Mol Biol.* 1996; 264: 556-566.

73. Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. and Gerstein, M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 2003; 4: 117.
74. Gronski, T. J., Jr., Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E. and Shapiro, S. D. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 12189-12194.
75. Gunja-Smith, Z., Morales, A. R., Romanelli, R. and Woessner, J. F., Jr. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1639-1648.
76. Haorah, J., Ramirez, S. H., Schall, K., Smith, D., Pandya, R. and Persidsky, Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem.* 2007; 101: 566-576.
77. Haq, F., Mahoney, M. and Koropatnick, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res.* 2003; 533: 211-226.
78. Harris, A. K., Ergul, A., Kozak, A., Machado, L. S., Johnson, M. H. and Fagan, S. C. Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci.* 2005; 6: 49.
79. Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. and Shinagawa, A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci.* 1994; 107: 2373-2379.
80. Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K. 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 Lett.* 1992; 298: 29-32.
81. He, S. Y., Matoba, R., Fujitani, N., Sodesaki, K. and Onishi, S. Cardiac muscle lesions associated with chronic administration of methamphetamine in rats. *Am J Forensic Med Pathol.* 1996; 17: 155-162.
82. Heath, E. I. and Grochow, L. B. Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors in cancer therapy. *Drugs.* 2000; 59: 1043-1055.
83. Heath, E. I., O'Reilly, S., Humphrey, R., Sundaresan, P., Donehower, R. C., Sartorius, S., Kennedy, M. J., Armstrong, D. K., Carducci, M. A., Sorensen, J. M., Kumor, K., Kennedy, S. and Grochow, L. B. Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY12-9566 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001; 48: 269-274.
84. Herget, J., Novotna, J., Bibova, J., Povysilova, V., Vankova, M. and Hampl, V. Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285: L199-208.

85. Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P. and Vasak, M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 133-145.
86. Hidalgo, M. and Eckhardt, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001a; 93: 178-193.
87. Hidalgo, M. and Eckhardt, S. G. Matrix metalloproteinase inhibitors: how can we optimize their development? *Ann Oncol.* 2001b; 12: 285-287.
88. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 1994; 354: 1-6.
89. Horstmann, S., Kalb, P., Koziol, J., Gardner, H. and Wagner, S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* 2003; 34: 2165-2170.
90. Huang, L., Kirschke, C. P., Zhang, Y. and Yu, Y. Y. The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 2005; 280: 15456-15463.
91. Chabot, F., Mertes, P. M., Delorme, N., Schrijen, F. V., Saunier, C. G. and Polu, J. M. Effect of acute hypercapnia on alpha atrial natriuretic peptide, renin, angiotensin II, aldosterone, and vasopressin plasma levels in patients with COPD. *Chest.* 1995; 107: 780-786.
92. Chait, A. and Wight, T. N. Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol.* 2000; 11: 457-463.
93. Chen, Y. F., Durand, J. and Claycomb, W. C. Hypoxia stimulates atrial natriuretic peptide gene expression in cultured atrial cardiocytes. *Hypertension.* 1997; 29: 75-82.
94. Chesnut, R. M., Marshall, L. F., Klauber, M. R., Blunt, B. A., Baldwin, N., Eisenberg, H. M., Jane, J. A., Marmarou, A. and Foulkes, M. A. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma.* 1993; 34: 216-222.
95. Cheung, P. Y., Sawicki, G., Wozniak, M., Wang, W., Radomski, M. W. and Schulz, R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation.* 2000; 101: 1833-1839.
96. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. and Seve, M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* 2004; 53: 2330-2337.
97. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979; 18: 5294-5299.
98. Christianson, D. W. Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem.* 1991; 42: 281-355.
99. Chung, L., Shimokawa, K., Dinakarbandian, D., Grams, F., Fields, G. B. and Nagase, H. Identification of the (183)RWTNNFREY(191) region as a critical segment of matrix

- metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. *J Biol Chem.* 2000; 275: 29610-29617.
100. Chung, R. S., Vickers, J. C., Chuah, M. I., Eckhardt, B. L. and West, A. K. Metallothionein-III inhibits initial neurite formation in developing neurons as well as postinjury, regenerative neurite sprouting. *Exp Neurol.* 2002; 178: 1-12.
101. Chung, R. S., Vickers, J. C., Chuah, M. I. and West, A. K. Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci.* 2003; 23: 3336-3342.
102. Ichinose, Y., Migita, K., Nakashima, T., Kawakami, A., Aoyagi, T. and Eguchi, K. Effects of bisphosphonate on the release of MMP-2 from cultured human osteoblasts. *Tohoku J Exp Med.* 2000; 192: 111-118.
103. Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D. and Okada, Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997; 322: 809-814.
104. Imajo, T. and Kazee, A. M. Diffuse axonal injury by simple fall. *Am J Forensic Med Pathol.* 1992; 13: 169-172.
105. Islam, M. N., Kuroki, H., Hongcheng, B., Ogura, Y., Kawaguchi, N., Onishi, S. and Wakasugi, C. Cardiac lesions and their reversibility after long term administration of methamphetamine. *Forensic Sci Int.* 1995; 75: 29-43.
106. Janssen, A. M., van Duijn, W., Kubben, F. J., Griffioen, G., Lamers, C. B., van Krieken, J. H., van de Velde, C. J. and Verspaget, H. W. Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 1889-1896.
107. Jarup, L. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17 Suppl 2: 35-39.
108. Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G. and Vahter, M. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health.* 1998; 24 Suppl 1: 1-51.
109. Jiang, W. and Bond, J. S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* 1992; 312: 110-114.
110. Johnson, D. D., Singh, M. B. and Cheung, C. Y. Effect of three hours of hypoxia on atrial natriuretic factor gene expression in the ovine fetal heart. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176: 42-48.
111. Johnson, T. S., Young, J. B. and Landsberg, L. Sympathoadrenal responses to acute and chronic hypoxia in the rat. *J Clin Invest.* 1983; 71: 1263-1272.

112. Jones, F. S. and Jones, P. L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn.* 2000; 218: 235-259.
113. Kaiho, M. and Ishiyama, I. Morphological study of acute myocardial lesions experimentally induced by methamphetamine. *Nippon Hoigaku Zasshi.* 1989; 43: 460-468.
114. Kalela, A., Koivu, T. A., Sisto, T., Kanervisto, J., Hoyhtya, M., Sillanaukee, P., Lehtimäki, T. and Nikkari, S. T. Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002; 62: 337-342.
115. Kang, Y. J., Zhou, Z. X., Wang, G. W., Buridi, A. and Klein, J. B. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13690-13698.
116. Katsuda, S. and Kaji, T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10: 267-274.
117. Keilin, D. and Mann, T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J.* 1940; 34: 1163-1176.
118. Kerr, M. A. and Kenny, A. J. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J.* 1974; 137: 477-488.
119. Kerrigan, J. J., Mansell, J. P. and Sandy, J. R. Matrix turnover. *J Orthod.* 2000; 27: 227-233.
120. Kimura, T., Fujita, I., Itoh, N., Muto, N., Nakanishi, T., Takahashi, K., Azuma, J. and Tanaka, K. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 299-302.
121. Kinugawa, S., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Ide, T., Suematsu, N., Satoh, S., Utsumi, H. and Takeshita, A. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res.* 2000; 87: 392-398.
122. Kivirikko, S., Saarela, J., Myers, J. C., Autio-Harmainen, H. and Pihlajaniemi, T. Distribution of type XV collagen transcripts in human tissue and their production by muscle cells and fibroblasts. *Am J Pathol.* 1995; 147: 1500-1509.
123. Kizek, R., Vacek, J., Adam, V. and Vojtěšek, B. Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin Biochem Metab.* 2004; 12 (33): 72-78.
124. Knauper, V., Murphy, G. and Tschesche, H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur J Biochem.* 1996; 235: 187-191.

125. Koh, J. Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., He, Y. Y., Hsu, C. Y. and Choi, D. W. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*. 1996; 272: 1013-1016.
126. Koh, K. K., Ahn, J. Y., Jin, D. K., Han, S. H., Kim, H. S., Choi, I. S., Ahn, T. H., Shin, E. K. and Jeong, E. M. Comparative effects of statin and fibrate on nitric oxide bioactivity and matrix metalloproteinase in hyperlipidemia. *Int J Cardiol*. 2004; 97: 239-244.
127. Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D., Ruppitsch, W. and Ulbrich, N. Activity of ternary gelatinase A-TIMP-2-matrix metallo-proteinase complexes. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994; 375: 589-595.
128. Kolkenbrock, H., Orgel, D., Hecker-Kia, A., Noack, W. and Ulbrich, N. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem*. 1991; 198: 775-781.
129. Korzus, E., Nagase, H., Rydell, R. and Travis, J. The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem*. 1997; 272: 1188-1196.
130. Kotaska, K., Zikmundova, K., Kukacka, J., Cepova, J. and Prusa, R. Effect of hypolipidemic therapy on serum matrix metalloproteinases activity and PAPP-A concentration. *Clinical Chemistry*. 2006; 52: A115-A115.
131. Kouwenhoven, M., Carlstrom, C., Ozenci, V. and Link, H. Matrix metalloproteinase and cytokine profiles in monocytes over the course of stroke. *J Clin Immunol*. 2001; 21: 365-375.
132. Kridel, S. J., Chen, E., Kotra, L. P., Howard, E. W., Mobashery, S. and Smith, J. W. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem*. 2001; 276: 20572-20578.
133. Kukacka, J., Bibova, J., Ruskoaho, H. and Pelouch, V. Protein remodeling of extracellular matrix in rat myocardium during four-day hypoxia: the effect of concurrent hypercapnia. *Gen Physiol Biophys*. 2007a; 26: 133-142.
134. Kukacka, J., Bibová, J., Ruskoaho, H. and Pelouch, V. Chronic hypoxia alters expression of extracellular matrix components in rat. *Phys Res*. 2002; 51: P21.
135. Kukacka, J., Petrlova, J., Prusa, R., Adam, V., Sures, B., Beklova, M., Havel, L. and Kizek, R. Changes of content of glutathione and metallothionein at plant cells and invertebrates treated by platinum group metals. *Faseb Journal*. 2006a; 20: A75-A75.
136. Kukacka, J., Prusa, R., Kotaska, K. and Pelouch, V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005; 149: 225-236.

137. Kukacka, J., Schwippelová, Z., Herget, J. and Pelouch, V. Protein remodeling of rat cardiovascular system induced by chronic hypoxia is affected by Batimastat - inhibitor of collagenolytic activity. *PhysiolRes.* 2000; 49: P12.
138. Kukacka, J., Vajtr, D., Huska, D., Prusa, R., Houstava, L., Samal, F., Diopan, V., Kotaska, K. and Kizek, R. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006b; 27 Suppl 2: 116-120.
139. Kukacka, J., Vajtr, D., Santorova, P., Kotaska, K. and Prusa, R. Cardiac muscle damage associated with chronic administration of methamphetamine in rats. *Faseb Journal.* 2007b; 21: A1133-A1134.
140. Lachmannova, V. and Herget, J. N-acetylcysteine (NAC) but not L-NAME inhibits pulmonary vascular effect of 5 days hypoxia in rats. *Physiol Res.* 2002; 51: 68P.
141. Lazo, J. S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A. E., Choo, K. H. and Pitt, B. R. Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5506-5510.
142. Lew, R. A. and Baertschi, A. J. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts. *Am J Physiol.* 1989; 257: H147-156.
143. Li, H., Simon, H., Bocan, T. M. and Peterson, J. T. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res.* 2000a; 46: 298-306.
144. Li, Y. Y., Feldman, A. M., Sun, Y. and McTiernan, C. F. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation.* 1998; 98: 1728-1734.
145. Li, Y. Y., Kadokami, T., Wang, P., McTiernan, C. F. and Feldman, A. M. MMP inhibition modulates TNF-[alpha] transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H983-H989.
146. Li, Y. Y., McTiernan, C. F. and Feldman, A. M. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* 2000b; 46: 214-224.
147. Lichtinghagen, R., Musholt, P. B., Lein, M., Romer, A., Rudolph, B., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Schnorr, D., Loening, S. A. and Jung, K. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol.* 2002; 42: 398-406.
148. Lijnen, H. R., Lupu, F., Moons, L., Carmeliet, P., Goulding, D. and Collen, D. Temporal and topographic matrix metalloproteinase expression after vascular injury in mice. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 799-807.

149. Lim, M., Martinez, T., Jablons, D., Cameron, R., Guo, H., Toole, B., Li, J. D. and Basbaum, C. Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett.* 1998; 441: 88-92.
150. Lima, J. A., Guzman, P. A., Yin, F. C., Brawley, R. K., Humphrey, L., Traill, T. A., Lima, S. D., Marino, P., Weisfeldt, M. L. and Weiss, J. L. Septal geometry in the unloaded living human heart. *Circulation.* 1986; 74: 463-468.
151. Lindsey, M., Wedin, K., Brown, M. D., Keller, C., Evans, A. J., Smolen, J., Burns, A. R., Rossen, R. D., Michael, L. and Entman, M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 2001; 103: 2181-2187.
152. Liu, J., Liu, Y., Goyer, R. A., Achanzar, W. and Waalkes, M. P. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci.* 2000a; 55: 460-467.
153. Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S. D., Shipley, J. M., Twining, S. S., Diaz, L. A., Senior, R. M. and Werb, Z. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell.* 2000b; 102: 647-655.
154. Liuzzi, J. P., Bobo, J. A., Lichten, L. A., Samuelson, D. A. and Cousins, R. J. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 14355-14360.
155. Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., Knutson, M. D., Ganz, T. and Cousins, R. J. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 6843-6848.
156. Lo, E. H., Wang, X. and Cuzner, M. L. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res.* 2002; 69: 1-9.
157. Loftus, I. M. and Thompson, M. M. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med.* 2002; 7: 117-133.
158. Lohi, J., Wilson, C. L., Roby, J. D. and Parks, W. C. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10134-10144.
159. Lombard, C., Saulnier, J. and Wallach, J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie.* 2005; 87: 265-272.
160. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

161. Lynch, J. R., Blessing, R., White, W. D., Grocott, H. P., Newman, M. F. and Laskowitz, D. T. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke*. 2004; 35: 57-63.
162. Lynch, J. R. and Laskowitz, D. T. Panel of Serum Markers for Rapid Diagnosis of Acute Stroke: Response. *Stroke*. 2004.
163. Maeno, Y., Iwasa, M., Inoue, H., Koyama, H. and Matoba, R. Methamphetamine induces an increase in cell size and reorganization of myofibrils in cultured adult rat cardiomyocytes. *Int J Legal Med*. 2000a; 113: 201-207.
164. Maeno, Y., Iwasa, M., Inoue, H., Koyama, H., Matoba, R. and Nagao, M. Direct effects of methamphetamine on hypertrophy and microtubules in cultured adult rat ventricular myocytes. *Forensic Sci Int*. 2000b; 113: 239-243.
165. Magga, J., Vuolteenaho, O., Tokola, H., Marttila, M. and Ruskoaho, H. Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms in cardiac overload-induced increase of B-type natriuretic peptide gene expression. *Circ Res*. 1997; 81: 694-702.
166. Maisch, B. Ventricular remodeling. *Cardiology*. 1996; 87: 2-10.
167. Makela, M., Larjava, H., Pirila, E., Maisi, P., Salo, T., Sorsa, T. and Uitto, V. J. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1999; 251: 67-78.
168. Malik, J., Stulc, T. and Ceska, R. Matrix metalloproteinases in isolated hypercholesterolemia. *Int Angiol*. 2005; 24: 300-303.
169. Malmstrom, B. G. Rack-induced bonding in blue-copper proteins. *Eur J Biochem*. 1994; 223: 711-718.
170. Marchenko, G. N., Ratnikov, B. I., Rozanov, D. V., Godzik, A., Deryugina, E. I. and Strongin, A. Y. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*. 2001; 356: 705-718.
171. McCullough, J., Clague, M. J. and Urbe, S. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol*. 2004; 166: 487-492.
172. McCullough, J., Row, P. E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M. J. and Urbe, S. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol*. 2006; 16: 160-165.
173. McGuire, M. and Bradford, A. Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. *Eur Respir J*. 2001; 18: 279-285.
174. McGwire, B. S., Chang, K. P. and Engman, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun*. 2003; 71: 1008-1010.

175. Miles, A. T., Hawksworth, G. M., Beattie, J. H. and Rodilla, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000; 35: 35-70.
176. Montaner, J., Alvarez-Sabin, J., Molina, C., Angles, A., Abilleira, S., Arenillas, J., Gonzalez, M. A. and Monasterio, J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke.* 2001; 32: 1759-1766.
177. Mori, T., Wang, X., Aoki, T. and Lo, E. H. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2002; 19: 1411-1419.
178. Morrell, N. W., Atochina, E. N., Morris, K. G., Danilov, S. M. and Stenmark, K. R. Angiotensin converting enzyme expression is increased in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1823-1833.
179. Mukherjee, D. and Sen, S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1141-1146.
180. Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18: 1163-1172.
181. Mun-Bryce, S., Wilkerson, A., Pacheco, B., Zhang, T., Rai, S., Wang, Y. and Okada, Y. Depressed cortical excitability and elevated matrix metalloproteinases in remote brain regions following intracerebral hemorrhage. *Brain Res.* 2004; 1026: 227-234.
182. Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F. and Perozzi, G. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol.* 1999; 277: G1231-1239.
183. Murphy, G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1995; 266: 55-60.
184. Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Connell, J. P. and Docherty, A. J. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem.* 1992; 267: 9612-9618.
185. Murphy, G. and Knauper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the 'hemopexin' domain? *Matrix Biol.* 1997; 15: 511-518.
186. Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M. I., Atkinson, S. J., Allan, J. A., Knight, C. G., Willenbrock, F. and Docherty, A. J. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem.* 1994; 269: 6632-6636.
187. Nagase, H., Suzuki, K., Morodomi, T., Enghild, J. J. and Salvesen, G. Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Suppl.* 1992; 1: 237-244.

188. Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
189. Nakagawa, O., Ogawa, Y., Itoh, H., Suga, S., Komatsu, Y., Kishimoto, I., Nishino, K., Yoshimasa, T. and Nakao, K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1280-1287.
190. Nattie, E. E., Bartlett, D., Jr. and Johnson, K. Pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy caused by intermittent hypoxia and hypercapnia in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 118: 653-658.
191. Neckar, J., Szarszoi, O., Herget, J., Ostadal, B. and Kolar, F. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol Res.* 2003; 52: 171-175.
192. Netzel-Arnett, S., Fields, G. B., Birkedal-Hansen, H., Van Wart, H. E. and Fields, G. Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. *J Biol Chem.* 1991; 266: 6747-6755.
193. Newby, A. C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1-31.
194. Nguyen, T., Sherratt, P. J. and Pickett, C. B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 233-260.
195. Nishikawa, N., Yamamoto, K., Sakata, Y., Mano, T., Yoshida, J., Miwa, T., Takeda, H., Hori, M. and Masuyama, T. Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 766-774.
196. Nordberg, M. and Nordberg, G. F. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000; 46: 451-463.
197. Obermuller, N., Morente, N., Kranzlin, B., Gretz, N. and Witzgall, R. A possible role for metalloproteinases in renal cyst development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280: F540-550.
198. Ogata, Y., Miura, K., Ohkita, A., Nagase, H. and Shirouzu, K. Imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 expression by tumor cells implicated in liver metastasis from colorectal carcinoma. *Kurume Med J.* 2001; 48: 211-218.
199. Ogawa, E., Saito, Y., Harada, M., Kamitani, S., Kuwahara, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, M., Hamanaka, I., Kajiyama, N., Takahashi, N., Nakagawa, O., Masuda, I., Kishimoto, I. and Nakao, K. Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte

- hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 765-776.
200. Ogawa, Y., Tamura, N., Chusho, H. and Nakao, K. Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001; 79: 723-729.
201. Ohnishi, J., Ohnishi, E., Jin, M., Hirano, W., Nakane, D., Matsui, H., Kimura, A., Sawa, H., Nakayama, K., Shibuya, H., Nagashima, K. and Takahashi, T. Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 747-764.
202. Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. and Okada, Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 1997; 272: 2446-2451.
203. Okada M, M. H., Ito Y, Fujiwara A. Low density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method. *Journal of Laboratory Clinical Medicine.* 1998; 132: 195-201.
204. Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. and Nagase, H. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem.* 1990; 194: 721-730.
205. Ooi, H., Cadogan, E., Sweeney, M., Howell, K., O'Regan, R. G. and McLoughlin, P. Chronic hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: H331-338.
206. Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J. and Pfeffer, M. A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet.* 2006; 367: 356-367.
207. Palmiter, R. D. and Findley, S. D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J.* 1995; 14: 639-649.
208. Palmiter, R. D. and Huang, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 744-751.
209. Pearce, L. L., Wasserloos, K., St Croix, C. M., Gandley, R., Levitan, E. S. and Pitt, B. R. Metallothionein, nitric oxide and zinc homeostasis in vascular endothelial cells. *J Nutr.* 2000; 130: 1467S-1470S.
210. Pei, D., Majmudar, G. and Weiss, S. J. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem.* 1994; 269: 25849-25855.
211. Pelouch, V., Dixon, I. M., Golfman, L., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 1993a; 129: 101-120.

212. Pelouch, V., Dixon, I. M., Sethi, R. and Dhalla, N. S. Alteration of collagenous protein profile in congestive heart failure secondary to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 1993b; 129: 121-131.
213. Pelouch, V. and Jirmar, R. Biochemical characteristics of cardiac collagen and its role in ventricular remodelling following infarction. *Physiol Res.* 1993; 42: 283-292.
214. Pelouch, V., Kolar, F., Ost'adal, B., Milerova, M., Cihak, R. and Widimsky, J. Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; 11: 177-185.
215. Pelouch, V., Milerova, M., Ostadal, B., Hucin, B. and Samanek, M. Differences between atrial and ventricular protein profiling in children with congenital heart disease. *Mol Cell Biochem.* 1995; 147: 43-49.
216. Penkowa, M. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *Febs J.* 2006; 273: 1857-1870.
217. Penkowa, M., Nielsen, H., Hidalgo, J., Bernth, N. and Moos, T. Distribution of metallothionein I + II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat. *J Comp Neurol.* 1999; 412: 303-318.
218. Peterson, J. T. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 677-687.
219. Peterson, J. T., Hallak, H., Johnson, L., Li, H., O'Brien, P. M., Sliskovic, D. R., Bocan, T. M., Coker, M. L., Etoh, T. and Spinale, F. G. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation.* 2001; 103: 2303-2309.
220. Petrova, J., Blastik, O., Prusa, R., Kukacka, J., Potesil, D., Mikelova, R., Adam, V., Zehnalek, J. and Kizek, R. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149: 485-488.
221. Petrova, J., Potesil, D., Mikelova, R., Blastik, O., Adam, V., Trnkova, L., Jelen, F., Prusa, R., Kukacka, J. and Kizek, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta.* 2006; 51: 5112-5119.
222. Philipsen, S. and Suske, G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 2991-3000.
223. Ponton, A., Coulombe, B. and Skup, D. Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res.* 1991; 51: 2138-2143.

224. Potáčová, A., Adamcová, M., Štěrba, M., Popelová, O. and Geršl, V. Role matrixových metaloproteináz při srdečním selhání. *Československá fyziologie*. 2005; 54: 168-175.
225. Prockop, D. J. and Kivirikko, K. I. *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy*. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64: 403-434.
226. Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G. and Galis, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 1996; 98: 2572-2579.
227. Rawlings, N. D., Morton, F. R. and Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: D270-272.
228. Ray, S. K., Dixon, C. E. and Banik, N. L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol*. 2002; 17: 1137-1152.
229. Reunanen, N., Westermarck, J., Hakkinen, L., Holmstrom, T. H., Elo, I., Eriksson, J. E. and Kahari, V. M. Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*. 1998; 273: 5137-5145.
230. Ries, C. and Petrides, P. E. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995; 376: 345-355.
231. Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L. and Glickman, M. H. Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem J*. 2004; 381: 275-285.
232. Ripa, S. and Ripa, R. Zinc cellular traffic: physiopathological considerations. *Minerva Med*. 1995; 86: 37-43.
233. Robert, V., Besse, S., Sabri, A., Silvestre, J. S., Assayag, P., Nguyen, V. T., Swynghedauw, B. and Delcayre, C. Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. *Lab Invest*. 1997; 76: 729-738.
234. Rodan, G. A. and Fleisch, H. A. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2692-2696.
235. Rohde, L. E., Ducharme, A., Arroyo, L. H., Aikawa, M., Sukhova, G. H., Lopez-Anaya, A., McClure, K. F., Mitchell, P. G., Libby, P. and Lee, R. T. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 1999; 99: 3063-3070.
236. Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma*. 1995; 12: 833-842.

237. Ross, R. S. and Borg, T. K. Integrins and the myocardium. *Circ Res.* 2001; 88: 1112-1119.
238. Rouet-Benzineb, P., Buhler, J. M., Dreyfus, P., Delcourt, A., Dorent, R., Perennec, J., Crozatier, B., Harf, A. and Lafuma, C. Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail.* 1999; 1: 337-352.
239. Ruskoaho, H., Leskinen, H., Magga, J., Taskinen, P., Mantymaa, P., Vuolteenaho, O. and Leppaluoto, J. Mechanisms of mechanical load-induced atrial natriuretic peptide secretion: role of endothelin, nitric oxide, and angiotensin II. *J Mol Med.* 1997; 75: 876-885.
240. Samson, S. L. and Gedamu, L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998; 59: 257-288.
241. Sato, M. and Kondoh, M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 196: 9-22.
242. Sato, T., Ito, A., Ogata, Y., Nagase, H. and Mori, Y. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces pro-matrix metalloproteinase 9 production in human uterine cervical fibroblasts but interleukin 1alpha antagonizes the inductive effect of TNFalpha. *FEBS Lett.* 1996; 392: 175-178.
243. Satoh, M., Shimada, A., Zhang, B. and Tohyama, C. Renal toxicity caused by cisplatin in glutathione-depleted metallothionein-null mice. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60: 1729-1734.
244. Seltzer, J. L., Lee, A. Y., Akers, K. T., Sudbeck, B., Southon, E. A., Wayner, E. A. and Eisen, A. Z. Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp Cell Res.* 1994; 213: 365-374.
245. Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I. and Welgus, H. G. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem.* 1991; 266: 7870-7875.
246. Shapiro, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 602-608.
247. Sheedy, W., Thompson, J. S. and Morice, A. H. A comparison of pathophysiological changes during hypobaric and normobaric hypoxia in rats. *Respiration.* 1996; 63: 217-222.
248. Shimamori, Y., Watanabe, Y. and Fujimoto, Y. Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1986; 34: 3333-3340.

249. Schacherer, C., Koops, D., Wiemer, J., Hartmann, A., Weis, M., Klepzig, H., Zeiher, A. M. and Olbrich, H. G. Extracellular matrix structure after heart transplantation. *Int J Cardiol.* 1999; 68: 115-120.
250. Sim, D. L. and Chow, V. T. The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics.* 1999; 59: 224-233.
251. Spiegel, S., Foster, D. and Kolesnick, R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 8: 159-167.
252. Spinale, F. G., Coker, M. L., Bond, B. R. and Zellner, J. L. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 2000a; 46: 225-238.
253. Spinale, F. G., Coker, M. L., Heung, L. J., Bond, B. R., Gunasinghe, H. R., Etoh, T., Goldberg, A. T., Zellner, J. L. and Crumbley, A. J. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation.* 2000b; 102: 1944-1949.
254. Spinale, F. G., Coker, M. L., Krombach, S. R., Mukherjee, R., Hallak, H., Houck, W. V., Clair, M. J., Kribbs, S. B., Johnson, L. L., Peterson, J. T. and Zile, M. R. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res.* 1999; 85: 364-376.
255. Spinale, F. G., Coker, M. L., Thomas, C. V., Walker, J. D., Mukherjee, R. and Hebbar, L. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res.* 1998; 82: 482-495.
256. Spinale, F. G., Tomita, M., Zellner, J. L., Cook, J. C., Crawford, F. A. and Zile, M. R. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol.* 1991; 261: H308-318.
257. Springman, E. B., Angleton, E. L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 364-368.
258. Stankovic, R. K., Chung, R. S. and Penkowa, M. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 484-489.
259. Stankovic, R. K. and Li, Z. Decreased neurofilament density in large myelinated axons of metallothionein-I, II knockout mice. *Neurosci Lett.* 2006; 402: 1-6.

260. Stegemann, H. and Stalder, K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta*. 1967; 18: 267-273.
261. Stetler-Stevenson, W. G. and Yu, A. E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*. 2001; 11: 143-152.
262. Stockmann, P. T., Will, D. H., Sides, S. D., Brunnert, S. R., Wilner, G. D., Leahy, K. M., Wiegand, R. C. and Needleman, P. Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia. *Circ Res*. 1988; 63: 207-213.
263. Stracke, J. O., Fosang, A. J., Last, K., Mercuri, F. A., Pendas, A. M., Llano, E., Ferris, R., Di Cesare, P. E., Murphy, G. and Knauper, V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett*. 2000; 478: 52-56.
264. Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. and Goldberg, G. I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995; 270: 5331-5338.
265. Suehiro, E., Fujisawa, H., Akimura, T., Ishihara, H., Kajiwara, K., Kato, S., Fujii, M., Yamashita, S., Maekawa, T. and Suzuki, M. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma*. 2004; 21: 1706-1711.
266. Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A. and Klagsbrun, M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem*. 1997; 272: 31730-31737.
267. Tan, Y., Sinniah, R., Bay, B. H. and Singh, G. Metallothionein expression and nuclear size in benign, borderline, and malignant serous ovarian tumours. *J Pathol*. 1999; 189: 60-65.
268. Taylor, D. M., Minotti, S., Agar, J. N. and Durham, H. D. Overexpression of metallothionein protects cultured motor neurons against oxidative stress, but not mutant Cu/Zn-superoxide dismutase toxicity. *Neurotoxicology*. 2004; 25: 779-792.
269. Teronen, O., Heikkila, P., Kontinen, Y. T., Laitinen, M., Salo, T., Hanemaaijer, R., Teronen, A., Maisi, P. and Sorsa, T. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 878: 453-465.
270. Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K. T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L. and Chatterjee, M. Metallothionein: An overview. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 993-996.
271. Thomas, C. V., Coker, M. L., Zellner, J. L., Handy, J. R., Crumbley, A. J., 3rd and Spinale, F. G. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV

- myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1998; 97: 1708-1715.
272. Tinianow, C. L., Tinianow, T. K. and Wilcox, M. Effects of hyperbaric oxygen on focal brain contusions. *Biomed Sci Instrum*. 2000; 36: 275-281.
273. Tomita, M., Okuyama, T., Katsuyama, H. and Ishikawa, T. Paraquat-induced gene expression in rat kidney. *Arch Toxicol*. 2006; 80: 687-693.
274. Tummalapalli, C. M., Heath, B. J. and Tyagi, S. C. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2001; 80: 512-521.
275. Tyagi, S. C. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol Cell Biochem*. 1997; 168: 1-12.
276. Tyagi, S. C. Extracellular matrix dynamics in heart failure: a prospect for gene therapy. *J Cell Biochem*. 1998; 68: 403-410.
277. Tyagi, S. C., Campbell, S. E., Reddy, H. K., Tjahja, E. and Voelker, D. J. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*. 1996a; 155: 13-21.
278. Tyagi, S. C., Kumar, S., Cassatt, S. and Parker, J. L. Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996b; 74: 983-995.
279. Tyagi, S. C., Kumar, S. and Katwa, L. Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29: 391-404.
280. Tyagi, S. C., Kumar, S., Voelker, D. J., Reddy, H. K., Janicki, J. S. and Curtis, J. J. Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. *J Cell Biochem*. 1996c; 63: 185-198.
281. Tyagi, S. C., Matsubara, L. and Weber, K. T. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem*. 1993a; 26: 191-198.
282. Tyagi, S. C., Ratajska, A. and Weber, K. T. Myocardial matrix metalloproteinase(s): localization and activation. *Mol Cell Biochem*. 1993b; 126: 49-59.
283. Uria, J. A. and Lopez-Otin, C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res*. 2000; 60: 4745-4751.
284. Vajtr, D., Kukacka, J. and Adamek, T. [Findings in myocardial extracellular matrix in fatal poisoning with addictive substances]. *Soud Lek*. 2002; 47: 54-58.

285. Vajtr, D., Kukacka, J., Samal, F., Prusa, R., Houstava, L., Merkerova, M. and Kracmarova, A. Pathomorphology, gene expression profile, levels of S-100b protein, and interleukine - 6 in expansive contusion area after trauma brain injury. *Faseb Journal*. 2007; 21: A398-A398.
286. Vajtr, D., Prusa, R., Houst'ava, L., Samal, F., Kukacka, J. and Pachi, J. [Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury]. *Soud Lek*. 2006; 51: 36-41.
287. Van Wart, H. E. and Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 5578-5582.
288. Varner, K. J., Ogden, B. A., Delcarpio, J. and Meleg-Smith, S. Cardiovascular responses elicited by the "binge" administration of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 301: 152-159.
289. Vasak, M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 2005; 19: 13-17.
290. Verma, R. P. and Hansch, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15: 2223-2268.
291. Vlodavsky, E., Palzur, E., Feinsod, M. and Soustiel, J. F. Evaluation of the apoptosis-related proteins of the BCL-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated by hyperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2005; 110: 120-126.
292. Vlodavsky, E., Palzur, E. and Soustiel, J. F. Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32: 40-50.
293. Vos, C. M., Gartner, S., Ransohoff, R. M., McArthur, J. C., Wahl, L., Sjulson, L., Hunter, E. and Conant, K. Matrix metalloprotease-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroimmunol*. 2000; 109: 221-227.
294. Wada, K., Sato, H., Kinoh, H., Kajita, M., Yamamoto, H. and Seiki, M. Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. *Gene*. 1998; 211: 57-62.
295. Wagner, G. C., Ricaurte, G. A., Seiden, L. S., Schuster, C. R., Miller, R. J. and Westley, J. Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. *Brain Res*. 1980; 181: 151-160.

296. Wagner, G. C., Seiden, L. S. and Schuster, C. R. Methamphetamine-induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs. *Drug Alcohol Depend.* 1979; 4: 435-438.
297. Wang, W., Sawicki, G. and Schulz, R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res.* 2002a; 53: 165-174.
298. Wang, X., Mori, T., Jung, J. C., Fini, M. E. and Lo, E. H. Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. *J Neurotrauma.* 2002b; 19: 615-625.
299. Wang, Y., Johnson, A. R., Ye, Q. Z. and Dyer, R. D. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33043-33049.
300. Weber, K. T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13: 1637-1652.
301. Weber, K. T., Sun, Y., Tyagi, S. C. and Cleutjens, J. P. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26: 279-292.
302. Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P. and Gearing, A. J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. (*Chem. Rev.* 1999, 99, 2735-2776. Published on the web september 8, 1999). *Chem Rev.* 2001; 101: 2205-2206.
303. Wilson, E. M. and Spinale, F. G. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med.* 2001; 33: 623-634.
304. Winslow, R. M., Samaja, M. and West, J. B. Red cell function at extreme altitude on Mount Everest. *J Appl Physiol.* 1984; 56: 109-116.
305. Wu, H. Y. and Kang, Y. J. Inhibition of buthionine sulfoximine-enhanced doxorubicin toxicity in metallothionein overexpressing transgenic mouse heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 287: 515-520.
306. Xie, B., Laouar, A. and Huberman, E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem.* 1998; 273: 11576-11582.
307. Xue, C. B., He, X., Roderick, J., DeGrado, W. F., Cherney, R. J., Hardman, K. D., Nelson, D. J., Copeland, R. A., Jaffee, B. D. and Decicco, C. P. Design and synthesis of cyclic inhibitors of matrix metalloproteinases and TNF-alpha production. *J Med Chem.* 1998; 41: 1745-1748.

308. Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W. and Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27: 697-709.
309. Yao, C., Donelson, J. E. and Wilson, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 132: 1-16.
310. Ye, S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000; 19: 623-629.
311. York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L. and Rock, K. L. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity.* 2003; 18: 429-440.
312. Yoshida, M., Ohta, H., Yamauchi, Y., Seki, Y., Sagi, M., Yamazaki, K. and Sumi, Y. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. *Biol Trace Elem Res.* 1998; 63: 167-175.
313. Yu, Q., Larson, D. F. and Watson, R. R. Heart disease, methamphetamine and AIDS. *Life Sci.* 2003; 73: 129-140.
314. Yu, Q., Montes, S., Larson, D. F. and Watson, R. R. Effects of chronic methamphetamine exposure on heart function in uninfected and retrovirus-infected mice. *Life Sci.* 2002; 71: 953-965.
315. Zagris, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron.* 2001; 32: 427-438.
316. Zelenski, N. G., Rawson, R. B., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21973-21980.
317. Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C., Zarrabi, H. M., Hurewitz, A. N., Matrisian, L., Boyd, D., Nicolson, G. and Montana, S. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 212-227.

Příloha: Seznam vlastních publikací

Původní práce a přehledné články v časopisech s definovaným impakt faktorem

1. Kukacka J., Prusa R., Sedlacek P. NO EFFECT OF HIGH-DOSES-METHOTREXATE Treatment on Serum Cardiac Troponin I Levels in Children. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2006; 23: 159-161.
IF=0,529
2. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R. Attomole Voltametric Determination of Metallothionein. *Electrochimica Acta* 2006; 51: 5112-5119
IF=2,955
3. Kukacka J., Vajtr D., Huska D., Prusa R., Houstava L., Samal F., Diopan V., Kotaska K., Kizek R. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 ; 27 (Suppl2):116-120
IF=0,924
4. Kukacka J., Bibova J., Ruskoaho H., Pelouch V.. Protein remodeling of extracellular matrix in rat myocardium during four-day hypoxia: the effect of concurrent hypercapnia. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26:133-42.
IF=0,771
5. Adam V., Blastik O., Krizkova S., Lubal P., Kukacka J., Prusa R., Kizek R. Using of Brdicka reaction for determination of metallothionein at patients with tumour diseases. *Chem. Listy* 2007, přijato k tisku
IF= 0,431
6. Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pachi J., Pažout J. Dynamika vývoje GCS, hladiny NSE a S100b v séru a morfologie expanzní kontuze u pacientů s poraněním hlavy. *Českoslov. Neurol. Neuroch.* 2007, 70/103 (5): 253-258.
IF=0,045

7. Ostadal P., Alan D., Vejvoda J., Cepova J., Kukacka J., Blasko P., Martinkovicova L., Vojacek J. Immediate effect of fluvastatin on lipid levels in acute coronary syndrome. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 19-23.
IF=1,862
8. Kotaska K., Petrak B., Kukacka J., Kraus J., Prusa R. Anti-vimentin antibodies and neuron-specific enolase in children with neurofibromatosis type-1. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007; 28 (6):XX-XX. Přijato k tisku
IF=0,924
9. Vajtr D., Benada O., Kukacka J., Prusa R., Houstava L., Toupalik P. and Kizek R. Ultrastructural Changes of Blood Brain Barrier in Expansive Contusions and Pathobiochemistry of Serum Proteins. *Phys Res* 2009; 58 (2): XX-XX. Přijato k tisku
IF=2,093

Ostatní původní práce a přehledné články

1. Vajtr D., Kukacka J., Adamek T. Findings in myocardial extracellular matrix in fatal poisoning with addictive substances. *Soudní Lékařství* 2002, 47(4):54-58.
2. Kukacka J., Prusa R., Kotaska K., Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149: 225-236.
1. Petřlova J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Potesil D., Mikelova R., Adam V., Zehnalek J., Kizek R. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):485-8.
2. Kukacka J., Průša R., Sedláček P. Serum levels of cardiac troponin I are not increased in patients on high-doses-methotrexate therapy. *Klin Biochem Metab.*

2006; 14 (35): 31-32

3. Petřlová J., Blašík O., Průša R., Kukačka J., Mikelová R., Stiborová M., Vojtěšek B., Adam V., Zítka O., Eckschlager T., Kizek R. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo maligním melanomem. *Klinická onkologie* 2006. 19 (2) :138-142.
4. Kotaska K., Popelova J., Tiserova M., Telekes P., Vrzanova M., Bronsky J., Halacova M., Kukacka J., Prusa R. NT-proBNP and BNP Values in Cardiac Patients with Different Degree of Left Ventricular Systolic Dysfunction. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006; 150 (1): 125-130
5. Zikmundová K., Průša R., Kukačka J., Zdráhalová K., Sedláček P. Izoenzymy alkalické fosfatázy u dítěte po transplantaci kostní dřeně s izolovanou jaterní reakcí štěpu proti hostiteli. *Klin.Biochem.Metab* 2006; 14 (35): 108-110
6. Vajtr D., Prusa R., Houst'ava L., Samal F.,Kukacka J., Pacht J. Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury. *Soudní lékařství* 2006;51(3):36-41.
7. Stuchlíková H., Dvořák P., Remešová S., Procházka J., Kukačka J., Průša R., Janda J., Vavřinec J. Závažná intoxikace olovem z keramické čajové konvice u desetileté dívky. *Čes.-slov. Pediat* 2006; 61 (12) : 692-696.
8. Kotaska K., Popelova J., Tiserova M., Telekes P., Vrzanova M., Bronsky J., Halacova M., Kukacka J., Prusa R. The relevance of brain natriuretic peptides investigation in various cardiovascular diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006; 150 (2): 285-288
9. Kukačka J., Zikmundová K., Kotaška K., Halačová M., Vajtr D., Průša R. PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klin.Biochem.Metab* 2007; 15 (36): 85-88

10. Kukačka J., Klapková E., Průša R. Presumptivní kombinované HPLC stanovení fetálního hemoglobinu využitím modu pro glykovaný hemoglobin. *Klin.Biochem.Metab* 2007; 15 (36): 157-159.
11. Klapkova E., Prusa R., Kukacka J., Kotaska K. Unexpected high serum level of CA-125 in male patient suffering from metastatic papillary carcinoma. *Klin.Biochem.Metab* 2007; 15 (36): 155-156.
12. Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pelichovská M., Strejc P., Toupalík P. Hodnocení závažnosti otřesu mozku a poruchy zdraví pomocí monitorování hladin neuron specifické enolázy a proteinu S-100b v séru. *Soudní Lékařství* 2007; 52 (3): 43-46.
13. Fabrik I., Adam V., Křížková S., Kukačka J., Průša R., Trnková L., Kizek R. Určení hladiny termostabilních thiolů u pacientů se zhoubným nádorem. *Klinická onkologie* 2007. 20 (6) :384-389.

Oponovaná abstrakta v časopisech s definovaným impakt faktorem

1. Kukacka J., Schwippelová Z., Herget J., Pelouch V. Protein remodeling of rat cardiovascular system induced by chronic hypoxia is affected by Batimastat - inhibitor of collagenolytic activity. *Physiol.Res.* 2000;49:P12.
IF=2,093
2. Adamcova M., Kukacka J., Pelouch V. Regulatory proteins in cardiac muscle of children with congenital heart diseases. *J.Mol Cell Cardiol.* 33,A1,2001.
IF=4,859
3. Kukacka J., Bíbová J., Ruskoaho H., Pelouch V. Chronic hypoxia alters expression of extracellular matrix components in rat. *Physiol.Res.* 51, P21,2002. *IF=2,093*
4. Kukacka J., Bíbová J., Ruskoaho H., Pelouch V. The effect of hypoxia and hypercapnia on remodeling of extracellular matrix in rat heart. *FASEB Journal* 16, A1116, 2002
IF=6,721
5. Kukacka J., Bíbová J., Ruskoaho H., Pelouch V. The remodeling of cardiac tissue after short and prolonged hypoxia. *Wound Repair and Regeneration* 11,A 33, 2003.
IF=2,23
6. Prusa R., Blastik O., Kukacka J., Zehnalek J., Adam V., Petrlova J., Kizek R. The influence of platinum-based drugs on the amount of metallothionein. *Toxicology Letters* 158, S66, 2005.
IF=2,784
7. Prusa R., Blastik O., Kukacka J., Kizek R., Stuchlikova H. Plasma metallothionein levels in lead poisoned child. *Toxicology Letters* 158, S156, 2005.
IF=2,784

8. Prusa R., Petřlova O., Blastik O., Adam V., Kukacka J., Kizek R. Induction of Synthesis of Metallothionein by Platinum Drugs. *Molecular Biology of the Cell* 16, Supplement 382a, 2005.
IF=6,562
9. Kukacka J., Dejmeck P., Prusa R. Serum selenium and Iron Levels in Newborns and Infants in Region with Selenium Deficiency. *The FASEB Journal* 19, A1016, 2005.
IF=6,721
10. Cepova J., Kukacka J., Prusa R. Smoking and serum selenium concentration in patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 6 (1), S154, 2005.
IF=3,811
11. Prusa R., Kukacka J., Sedlacek P. Effect of High-dosis Therapy on serum Cardiac Troponin I Levels. *Clinical Chemistry* 51 (6), A9, 2005.
IF=5,454
12. Kukacka J., Cepova J., Prusa R., Kotaska K. Smoking is associated with higher cadmium levels in blood but not with lead. *Toxicology Letters* 158, S158, 2005.
IF=2,784
13. Kukacka J., Petřlova J., Prusa R., Adam V., Sures B., Beklova M., Havel L., Kizek R. Changes of content of glutathione and metallothionein at plant cells and invertebrates treated by platinum group metals. *FASEB J.* 2006. 20 (4) : A75.
IF=6,721
14. Kukacka J., Vajtr D., Bibova J., Santorova P., Kotaska K., Prusa R. Administration of methamphetamine affects serum levels of trace elements in rats. *FASEB J.* 2006. 20 (4) : A195.
IF=6,721

15. Kukacka J., Kotaska K., Popelova J., Vrzanova M., Prusa R. Comparison of natriuretic peptides A and B in cardiac patients with different degree of left ventricular systolic dysfunction. . *FASEB J.* 2006. 20 (5) : A1196.
IF=6,721
16. Prusa R., Petrova J., Kukacka J., Adam V., Sures B., Beklova M., Kizek R. Study of interaction of glutathiones and metallothionenin with cytostatics. *Clinical Chemistry* 2006; 52 (6): A175
IF=5,454
17. Kotaska K., Petrak B., Kukacka J., Prusa R. Anti-vimentin antibodies and NSE in children with neurofibromatosis. . *Clinical Chemistry* 2006; 52 (6): A35
IF=5,454
18. Kotaska K., Zikmundova K., Kukacka J., Cepova J., Prusa R. Effect of hypolipidemic therapy on serum matrix metalloproteinases activity and PAPP-A concentration. *Clinical Chemistry* 2006; 52 (6): A115
IF=5,454
19. Bronsky J., Karpisek M., Kukacka J., Flajsmanova K., Kotaska K., Stechova K., Nevoral J., Prusa R.: Adiponectin AFABP and EFABP breast milk levels in first six months of lactation, *CCLM* Vol. 45, 2007, Special Supplement, T344.
IF=1,725
20. Kotaska K., Adam V., Petrak B., Kukacka J., Kizek R., Prusa R.: Serum levels of metalothionein in pediatric patients with neurofibromatosis type 1, *CCLM* Vol. 45, 2007, Special Supplement, W335.
IF=1,725
21. Kukacka J., Krizkova S., Zitka O., Prusa R., Adam V., Sures B., et al. Study of nucleic acids interactions with platinum based cytostatics using biosensor. *Faseb Journal* 2007;21:A262-A.
IF=6,721

22. Kukacka J., Vajtr D., Santorova P., Kotaska K., Prusa R. Cardiac muscle damage associated with chronic administration of methamphetamine in rats. *FASEB Journal* 2007;21:A1133-A4.
IF=6,721
23. Kukacka J., Zitka O., Horna A., Stejskal K., Zehnalek J., Adam V., et al. A new tool for distinguishing of different structural forms of lactoferrin. *FASEB Journal* 2007;21:A635-A.
IF=6,721
24. Kukacka J., Vajtr D., Prusa R., Klappkova E., Samal F., Houstava L., Pelichovska M., Kotaska K.: Serum levels of metalloproteinases in expansive and non-expansive contusion in traumatic brain injury, *CCLM* Vol. 45, 2007, Special Supplement, W214.
IF=1,725
25. Prusa R., Hanustiak P., Adam V., Hodek P., Kukacka J., Stiborova M., Beklova M., Trnkova L., Horna A., Kizek R.: Electroanalytical method for determination of flavonoids, *CCLM* Vol. 45, 2007, Special Supplement, M350.
IF=1,725
26. Vajtr D., Kukacka J., Samal F., Prusa R., Houstava L., Merkerova M., Kracmarova A. Pathomorphology, gene expression profile, levels of S-100b protein, and interleukine - 6 in expansive contusion area after trauma brain injury. *J Neuropath Exper Neurology* 2007; 66 (5): 448-449.
IF=4,371
27. Vajtr D., Kukacka J., Samal F., Prusa R., Houstava L., Merkerova M., Kracmarova A. Pathomorphology, gene expression profile, levels of S-100b protein, and interleukine - 6 in expansive contusion area after trauma brain injury. *FASEB Journal* 2007;21:A398-A.
IF=6,721

28. Adam V., Krizkova S., Fabrik I., Zitka O., Horakova Z., Binkova H., Hrabeta J., Eckschlager T., Kukacka J., Prusa R., Sykorova E., Kizek R. Metallothioneins as a new potential tumor marker. *Tumor Biology* 2007; 28 (suppl 1): 43-43.
IF=2,407
29. Vajtr D., Kukacka J., Adam V., Kotaska K., Hostava L., Toupalik P., Kizek R., Prusa R. serum levels metallothionein in expansive contusions, interleukine-6, and TNF alfa during reparative phase of the blood brain barrier damage. *Tumor Biology* 2007; 28 (suppl 1): 44-44.
IF=2,407
30. Adam V., Fabrik I., Nakielna J., Hrdinova V., Blahova P., Krizkova S., Kukacka J., Prusa R., Kizek R. New perspectives in electrochemical determination of metallothioneins. *Tumor Biology* 2007; 28 (suppl 1): 79-79.
IF=2,407
31. Zitak O., Huska D., Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Hrabeta J., Kukacka J., Prusa R., Trnkova L., Horna A., Beklova M., Kizek R. Study of binding of platinum based cytostatics to DNA structure; influence of glutathione. *Tumor Biology* 2007; 28 (suppl 1): 123-123.
IF=2,407

Ostatní abstrakta v časopisech a ve sbornících

1. Kukacka J., Vajtr D., Bibova J., Adamek T. The effect of chronic administration of methamphetamine on cardiac muscle in rats. In *Late Breaking Abstracts*. Experimental Biology 2004: April 17-21 Washington DC, USA, 2004. s.A82.
2. Čepová J., Kukačka J., Boubelíková A., Kučerová M., Průša R. Vliv kouření na koncentraci selenu v krvi u pacientů s poruchou lipidového metabolismu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004; 7 (Suppl 3): S14.

3. Stejskal J., Kuchynková Z., Mráková A., Kukačka J. Sporadická pyrofosfátová dna napodobující nádor příušní žlázy. In KODET R. (eds.). XXXI. Sjezd společnosti patologů ČLS.J.E. Purkyně: Praha, Czech Republic, 2004, s.23.
4. Kukacka J., Vajtr D., Adamek T., Prusa R. Comparison of morphological and biochemical changes after application of methamphetamine to rats and in diseased abusers. In HOJSÍK, D. (eds.). 46th May Medicolegal conference: May 25-26, Bratislava, Slovakia, 2005.
5. Blašík O., Petřelová J., Kukačka J., Průša R., Adam V., Potěšil D., Mikelová R., Zehnálek J., Stuchlíková H., Kizek R. Změny hladiny metalothioneinu v průběhu těžké otravy olovem. In KOSNA P. (eds.) VII Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie: Olomouc, Czech Republic, 2005. s. 21. ISBN 80-239-5267-6
6. Tošnerová J., Vokráčková K., Kukačka J., Čepová J., Průša R. Vliv kouření na koncentraci stopových a toxických kovů v krvi. In KOCNA P (eds.). BIOLAB 2005; 42. Celostátní sjezd biochemických laborantů: Liberec, Czech Republic, 2005, s.32-32. ISSN 1213-8363.
7. Petrova J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Potesil D., Mikelova R., Adam V., Zehnalek J., Kizek R. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomed. Papers*, 2005, roč. 149. č. Supplement 1, s. 16-16. ISSN 1213-8118.
8. Petrova J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Potesil D., Mikelova R., Adam V., Zehnalek J., Kizek R. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. In ULRICHOVÁ, J. (eds.). Toxcon 2005; 10. Interdisciplinary Czech and Slovak Toxicological Conference: Palacký University. Olomouc, Czech Republic, 2005, s. 16-16. ISSN 1213-8118.

9. Zikmundová K., Kukačka J., Čepová J., Kotaška K., Průša R. Vliv léčby hypolipidemiky na sérovou aktivitu matrixových metaloproteináz a koncentraci PAPP-A. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8 (Suppl 3): S49.
10. Blastik O., Svoboda M., Prusa R., Kukačka J., Stiborova M., Adam V., Petrova J., Beklova M., Zehnalek J., Kizek R. Ověření senzitivity potenciometrického stanovení metalothioneinu jako potencionálního markeru nádorových onemocnění. In HAJDUCH, M. (eds.). *Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie: December 9 – 10*, Solen. Olomouc, Czech republic, 2005, s.35-36. ISBN 80-239-6302-3.
11. Svoboda M., Blastik O., Prusa R., Kukačka J., Zitka O., Adam V., Petrova J., Zehnalek J., Kizek R. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů s nádorovým onemocněním. In HAJDUCH, M. (eds.). *Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie: December 9 - 10*, Solen. Olomouc, Czech republic, 2005, s. 48. ISBN 80-239-6302-3.
12. Vokráčková K., Tošnerová J., Kukačka J., Tkaczyk J., Průša R. Koncentrace manganu a selenu v pupečnickové krvi fyziologických a nezralých novorozenců. In KOCNA ,P. (eds.). *Biolab 2006; 43. Celostátní sjezd biochemických laborantů: May 21-23*, Český Krumlov, Czech Republic, 2006, s.36-37. ISSN 1213-8363.
14. Vajtr D. , Průša R., Hošťava L, Šámal F., Kukačka J. , Zámečník J., Klapková E. Comparasion of cortical biopsy with changes of serum markers after brain injury in two patients. In HOJSÍK, D. (eds.). *46th May Medicolegal conference: May 30-31*, Bratislava, Slovakia, 2006, Abstract #23.
15. Vajtr D. , Průša R., Hošťava L, Pelichovská M., Šámal F., Kukačka J. Hľadiny neuron specifické enolázy a S100B proteinu v séru u pacientů s otřesem mozku v.s. difúzním axonálním poraněním. In HOJSÍK, D. (eds.). *46th May Medicolegal conference: May 30-31*, Bratislava, Slovakia, 2006, Abstact #24.

16. Vajtr D, Průša R, Zámečník J., Kukačka J., Pelichovská M.: Hodnocení vitality mozkové tkáně měřením hladin vybraných biochemických markerů a nálezy v elektronové mikroskopii. In ZUNA (eds.). Vědecká konference 2. LF UK: Praha, Czech Republic, 2006, č. 25.
17. Svoboda M., Blašík O., Průša R., Kukačka J., Binková H., Horáková Z., Zítka O., Adam V., Petřlová J., Zehnálek J., Kizek R. Změny obsahu metalothioneinu v séru pacientů s nádorovým onemocněním. In ŽALOUĐÍK, J. and VYZULA, R. (eds.). XXX. Brněnské onkologické dny: May 11-13, Brno, Czech Republic, 2006, 260-263. ISBN 80-86793-06-0
18. Blašík O., Svoboda M., Tóthová E., Binková H., Horáková Z., Salzman R., Průša R., Kukačka J., Potěšil D., Adam V., Petřlová J., Kizek R. Změny hladiny metalothioneinu v průběhu léčby nádorového onemocnění. In ŽALOUĐÍK, J. and VYZULA, R. (eds.). XXX. Brněnské onkologické dny: May 11-13, Brno, Czech Republic, 2006, 263-266. ISBN 80-86793-06-0
19. Štern P., Kotaška K., Kukačka J., Průša R. Příprava bakalářů pro zdravotnické laboratoře. In ADAM et al. (eds.). FONS Sympozium klinické biochemie: Pardubice, Czech Republic, 2006, p. 45, ISBN 80-903167-7-8.
20. Kukačka J., Kotaška K., Štern P., Průša R. Výuka zdravotních laborantů na UK 2.LF. In ADAM et al. (eds.). FONS 2006. Sympozium klinické biochemie: Pardubice, Czech Republic, 2006, p. 46, ISBN 80-903167-7-8.
21. Kukačka J., Tkaczyk J., Průša R. Mangan, diagnostický přínos a význam pro klinickou praxi. In ADAM et al. (eds.). FONS Sympozium klinické biochemie: Pardubice, Czech Republic, 2006, p. 88, ISBN 80-903167-7-8.
22. Húska D., Zítka O., Fabrik I., Adam V., Hraběta J., Eckschlager T., Horáková Z., Binková H., Kukačka J., Průša R., Havel L., Trnková L., Kizek R. Aplikace katalytických signálů pro rychlé určení koncentrace proteinů významných

- v onkologii. In HAJDÚCH (eds.). II. Dny diagnostické , prediktivní a experimentální onkologie: Olomouc, Czech Republic, 2006, p.44, ISBN 80-239-8240-0.
23. Prusa R., Vajtr D., Kukacka J., Hostava L., Samal F., Kracmarova A., Merkerova M., Benada O. Gene Expression Profile and Serum Levels of NSE and S100b Protein in Patients with Trauma Brain Injury during 10 Days of Hospitalization. *Mol.Biol.Cell* 17 (suppl), abstract # 1340/B634. (CD-ROM)
24. Zitka O., Húska D., Kukačka J., Křížková S., Horáková Z., Adam V., Binková H., Průša R., Horna A., Beklová M., Havel L., Kizek R. Sledování interakce glutathionu s cisplatinou pomocí průtokové injekční analýzy. In HAJDÚCH (eds.). II. Dny diagnostické , prediktivní a experimentální onkologie: Olomouc, Czech Republic, 2006, p.45, ISBN 80-239-8240-0.
25. Svoboda M., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Zitka O., Adam V., Petrova J., Zehnalek J., Kizek R. Changing of metallothionein content at patients with tumour diseases. In WIMMEROVA, M.; BENES P. (eds.). X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů: February 8-9, Masarykova univerzita. Brno, Czech republic, 2006, p. 96-97.
26. Svoboda M., Blastik O., Sobrova P., Prusa R., Kukacka J., Binkova H., Horakova Z., Adam V., Kizek R. Metallothionein as a potential tumor disease marker In BOHACOVA, V.; BREIER A.; ZBYNOVSKA D.; ZLIECHOVEC J. (eds.). XX. Biochemický zjazd: Sept 12 - 16, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences. Piestany, Slovakia, 2006, p. 170, L 7.12.
27. Svoboda M., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Binkova H., Zitka O., Adam V., Zehnalek J., Kizek R. Senzitivní elektrochemická detekce potencialních nádorových markerů. In HORNA, A.; KIZEK R. (eds.). 2. letní škola elektrochemické a coulometrické detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií: July 13, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno, Czech Republic, 2006, p. 53-58.

28. Svoboda M., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Zitka O., Adam V., Eckchlager T., Petrova J., Kizek R. Content of metallothionein at blood serum of patients with tumour diseases. In NAVAROVA, J.; UJHAZY E.; DUBOVICKY M.; MACH M. (eds.). Toxcon 2006; 11. Interdisciplinary Slovak-Czech Toxicological Conference: June 5-7, Slovak Toxicology Society SETOX. Trencianske Teplice, Slovakia, 2006, p. 58-59.
29. Kizek R., Blastik O., Horakova Z., Zitka O., Binkova H., Adam V., Krizkova S., Horna A., Kukacka J., Prusa R. Změny hladiny thiolových sloučenin u pacientů se zhoubnými nádory. In SRAMKOVA, K.; CHLEBO P.; BALOGHOVA M. (eds.). Vyziva a potraviny pre tretie tisícrocie: Nov 23 - 24, Slovak Agricultural University in Nitra. Nitra, Slovakia, 2006, p. 133-136.
30. Krizkova S., Adam V., Blastik O., Horakova Z., Binkova H., Trnkova L., Horna A., Kukacka J., Prusa R., Kizek R. Přehled rozdílných analytických metod pro stanovení metalothioneinu v tkáních. In SRAMKOVA, K.; CHLEBO P.; BALOGHOVA M. (eds.). Vyziva a potraviny pre tretie tisícrocie: Nov 23 - 24, Slovak Agricultural University in Nitra. Nitra, Slovakia, 2006, p. 149-152.
31. Krizkova S., Adam V., Blastik O., Hrabeta J., Eckschlager T., Horna A., Kukacka J., Prusa R., Kizek R. Metallothionein jako pravděpodobná příčina rezistence vůči platinovým cytostatikům. In SRAMKOVA, K.; CHLEBO P.; BALOGHOVA M. (eds.). Vyziva a potraviny pre tretie tisícrocie: Nov 23 - 24, Slovak Agricultural University in Nitra. Nitra, Slovakia, 2006, p. 153-156.
32. Blastik O., Svoboda O., Prusa R., Kukacka J., Stiborova M., Adam V., Petrova J., Beklova M., Zehnalek J., Kizek R. Evaluation of sensitivity of electrochemical determination of metallothionein. In WIMMEROVA, M.; BENES P. (eds.). X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů: February 8-9, Masarykova univerzita. Brno, Czech republic, 2006, p. 58-59.
33. Blastik O., Svoboda O., Prusa R., Kukacka J., Stiborova M., Adam V., Petrova J., Beklova M., Zehnalek J., Kizek R. Evaluation of sensitivity of metallothionein

- determination by means of electrochemical techniques. In NAVAROVA, J.; UJHAZY E.; DUBOVICKY M.; MACH M. (eds.). Toxcon 2006; 11. Interdisciplinary Slovak - Czech Toxicological Conference: June 5 - 7, Slovak Toxicology Society SETOX. Trencianske Teplice, Slovakia, 2006, p. 21-21.
34. Adam V., Křížková S., Fabrik I., Šobrová P., Stejskal K., Zítka O., Hraběta J., Eckschlager T., Kukačka J., Průša R., Horáková Z., Binková H., Horna A., Kizek R., Thioly a nádorová onemocnění, vidíme veškeré souvislosti? In ŽALOUDÍK, J. and VYZULA, R. (eds.). XXXI. Brněnské onkologické dny: April 23-25, Brno, Czech Republic, 2007, 392-395. ISBN 978-9780-86793-09-2
35. Fabrik I., Kukačka J., Adam V., Průša R., Stiborová M., Trnková L., Kizek R. Studium obsahu metalothioneinu v krvi pacientů se změněnou hladinou mědi nebo cis-platiny pomocí automatizované elektrochemické detekce. In EYBL, V. et al. (eds.). 12. mezioborová česko-slovenská toxikologická konference: June 11-13, Praha, Czech Republic 2007, p. 59, ISBN 978-80-7071-283-2
36. Kizek R., Zítka O., Adam V., Křížková S., Horna A., Kukačka J., Průša R., Trnková L. Elektrochemické techniky jako nástroje pro studium změny hladiny triolových sloučenin u pacientů se zhoubnými nádory. In TRNKOVÁ, L., JANDERKA P., and KIZEK, R. (eds.). VII pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků: 2007 January 29-30, Brno, Czech Republic 2007, p.79-80. ISBN 9788021042353
37. Kukačka J., Vajtr D, Adam V, Bradková E, Srbová M, Kotaška K, Toupalík P, Kizek R, Průša R. Toxické účinky chronického podávání metamfetaminu u laboratorního potkana. In EYBL, V. et al. (eds.). 12. mezioborová česko-slovenská toxikologická konference: June 11-13, Praha, Czech Republic 2007, p.58, ISBN 978-80-7071-283-2
38. Kukačka J., Fabrik I, Stejskal K, Sotorník I, Vajtr D, Zikmundová K, Kizek R, Průša R. Vliv podávání stroncia na koncentraci metalothioneinu a jiných thiolů. In EYBL, V. et al. (eds.). 12. mezioborová česko-slovenská toxikologická konference: June 11-13, Praha, Czech Republic 2007, p.59, ISBN 978-80-7071-283-2

39. Strejc P., Vajtr D., Hubáčková L., Boubelík O., Průša R., Kukačka J. Vyšetření glykogen-dependentní fosforylázy u náhlé smrti a sérové hladiny kardiomarkerů. In LOYKA, S. (eds.). XIV. Rozmaričovy soudnělékařské pracovní dny, May 16-18, Kouty nad Desnou, Czech Republic, p. 15-16.
40. Šobrová P., Adam V., Fabrik I., Křížková S., Kukačka J., Průša R., Strnádel J., Horák V., Kizek R. Hladina metalothioneinu v melaninech. In ŽALOUĐÍK, J. and VYZULA, R. (eds.). XXXI. Brněnské onkologické dny: April 23-25, Brno, Czech Republic, 2007, p. 401-403. ISBN 978-9780-86793-09-2
41. Vajtr D., Toupalík P., Zámečník J., Kukačka J., Matlach R., Průša R., Pažout J., Houšťava L. Změny hematoencefalické bariéry u expanzních kontuzí v prvních dnech po poranění mozku. In LOYKA, S. (eds.). XIV. Rozmaričovy soudnělékařské pracovní dny, May 16-18, Kouty nad Desnou, Czech Republic 2007. p.16-17.
42. Zítka O., Húska D., Kukačka J., Křížková S., Adam V., Průša R., Horna A., Beklová M., Havel L., Trnková L., Kizek R. Elektrochemická Studie interakce glutathionu s cisplatinou. In TRNKOVÁ, L., JANDERKA P., and KIZEK, R. (eds.). VII pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků: 2007 January 29-30, Brno, Czech Republic 2007, 140-141. ISBN 9788021042353
43. Kukačka J., Tesfaye H., Mališ J., Vajtr D., Průša R. Terapeutické monitorování karboplatiny u dětských pacientů se solidními tumory pomocí bezplamenové absorpční spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* 2007; 15 (36) Supplement: 72-72.
44. Vajtr D., Kukačka J., Kotaška K., Houšťava L., Toupalík P., Klapková E., Průša R. Hladiny cytokinů, růstových faktorů a TNF alfa v reparativní fázi po poranění hematoencefalické bariéry u pacientů s kontuzemi mozku. *Klinická biochemie a metabolismus* 2007; 15 (36) Supplement: 84-84.

45. Tesfaye H., Kukačka J., Mališ J., Průša R., Starý J. Possibility of carboplatin AUC monitoring in paediatric oncology patients: a preliminary report. In GRUNDMANN (eds.). III. Česko-slovenská konference klinické farmakologie: 2007 October 18-20, Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic, 46-47. ISBN 978-80-7368-333-7.