

基质金属蛋白酶对圆锥角膜的影响

贾洪真^{1,2}, 彭秀军^{1,2}

基金项目:北京市科技计划课题(No. Z151100004015217)

作者单位:¹(100853)中国北京市,解放军医学院;²(100048)中国北京市,海军总医院眼科

作者简介:贾洪真,解放军医学院在读博士研究生,海军总医院眼科主治医师,研究方向:紫外光 A/核黄素角膜交联治疗圆锥角膜的基础和临床。

通讯作者:彭秀军,医学博士,教授,主任医师,解放军医学院博士研究生导师,研究方向:白内障、眼外伤、角膜胶原交联。pxj1@vip.sina.com

收稿日期:2016-05-16 修回日期:2016-07-28

Effect of matrix metalloproteinases in keratoconus

Hong-Zhen Jia^{1,2}, Xiu-Jun Peng^{1,2}

Foundation item: Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. Z151100004015217)

¹Department of Ophthalmology, Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; ²Department of Ophthalmology, PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Xiu-Jun Peng. Department of Ophthalmology, PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China. pxj1@vip.sina.com

Received:2016-05-16 Accepted:2016-07-28

Abstract

• Keratoconus is characterized by progressive corneal thinning and protrusion, resulting in irregular astigmatism and visual impairment. Numerous studies show that matrix metalloproteinases (MMPs) play a key role in matrix degradation and thinning process. Corneal crosslinking (CXL) is a recently developed noninvasive treatment method which can delay or even prevent progression of keratoconus. Most studies focused on effect of CXL on corneal biomechanics and structure, but less on MMPs. Researches have shown that MMPs in tears of patients with keratoconus after CXL change, however alterations of those in corneal matrix remain unclear. Further study on the changes of MMPs after CXL is helpful to understand pathophysiological processes of postoperative keratoconus and mechanism of CXL stabilizing course of keratoconus.

• KEYWORDS: keratoconus; matrix metalloproteinase; corneal crosslinking; riboflavin

Citation: Jia HZ, Peng XJ. Effect of matrix metalloproteinases in keratoconus. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(9):1644-1647

摘要

圆锥角膜以进行性角膜前突和变薄,导致不规则散光和视功能损害为特征。大量研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在圆锥角膜基质降解和变薄过程中起关键性作用。紫外光 A/核黄素角膜交联术(corneal crosslinking, CXL)是近年来发展起来的唯一能够延缓甚至阻止圆锥角膜病情进展的保守治疗方法。CXL对角膜生物力学和结构的影响研究较多,而对MMPs的影响研究较少。研究表明,CXL后患者泪液中的MMPs出现变化,而对基质中MMPs的影响尚无报道。进一步研究CXL后MMPs的变化有助于理解CXL后圆锥角膜的病理生理进程,以及CXL稳定圆锥角膜病情的作用机制。

关键词:圆锥角膜;基质金属蛋白酶;角膜交联;核黄素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.9.11

引用:贾洪真,彭秀军.基质金属蛋白酶对圆锥角膜的影响.国际眼科杂志2016;16(9):1644-1647

0 引言

圆锥角膜以进行性角膜前突和变薄,导致不规则散光和视功能损害为特征,是一种双侧性角膜扩张性疾病,通常在青春期发病,病情不同程度进展,直到三四十岁趋于稳定^[1]。圆锥角膜的角膜基质细胞密度降低、胶原板层数量减少、成纤维细胞降解^[2]。此外,胶原板层总体结构改变、胶原纤维不均匀分布,圆锥顶点处尤为明显^[3]。正是由于基质胶原纤维数量减少和细胞外基质结构改变引起圆锥角膜变薄^[4-5]。而且,前弹力层中央部分结构异常,前弹力层断裂,常填充基质胶原^[1]。圆锥角膜中央部分上皮变薄,其程度与前弹力层断裂呈正相关。后弹力层可以发生破裂或形成皱褶。目前一致认为,圆锥角膜可能是多因素、多基因疾病,遗传和环境因素在发病中扮演着同样重要的角色。圆锥角膜变薄,可能是由细胞外基质成分降解和角膜基质细胞丢失引起,但是这些变化始动因素尚未阐明。研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可能在圆锥角膜基质降解和变薄过程中起关键性作用^[6]。

紫外光 A/核黄素角膜交联术(corneal crosslinking, CXL)应用紫外光 A 和核黄素,通过光敏氧化作用,诱导胶原纤维间共价键交联形成,增加胶原纤维硬度,提高角膜生物力学特性,是近年来发展起来的,可以延缓或阻止圆锥角膜进展的保守治疗方法。CXL引起角膜基质的变化包括角膜硬度和弹性模量增加,皱缩温度增加,膨胀率降低,胶原纤维直径和厚度增加,对抗酶降解的抵抗力增加,产生大分子聚合物,角膜通透性降低^[7]。CXL可导致角膜上皮细胞损伤修复和角膜基质细胞凋亡、增殖、移行,可对MMPs的含量和活性产生影响。MMPs在圆锥角

膜的病理过程中起重要作用,并参与 CXL 后角膜基质的重塑过程。本文系统性回顾圆锥角膜中 MMPs 的含量变化及 CXL 的影响。

1 MMPs 概述

金属蛋白酶包括内肽酶和外肽酶,涉及众多生物过程,如形态发生、生物活性肽和激素的新陈代谢、发育、细胞周期法则、细胞增殖、移行、粘附和抗生素的新陈代谢^[8]。人类的金属蛋白酶,即 MMPs,属于 M10 家族,是一个钙依赖性的含锌内肽酶家族,主要作用于细胞外基质,包括胶原、弹力蛋白、明胶、基质糖蛋白和蛋白聚糖,促进组织重塑和降解,同时可通过蛋白酶解加工作用来调节细胞因子和化学因子的活性;参与众多病理生理过程,如骨骼生长和重塑、损伤修复、癌、关节炎和多发性硬化;其活性和表达失衡常常是癌症、神经退行性变、炎症、关节炎和心血管疾病的基础^[3]。根据作用底物和结构特点,人类 MMPs 分为 5 个亚组:(1)胶原酶,即 MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18, 主要裂解 I、II、III 胶原纤维。(2)明胶酶,即 MMP-2, MMP-9, 主要裂解变性胶原(明胶)和 IV 型胶原,也可裂解 I、II、III 胶原纤维。(3)基质溶素,即 MMP-3, MMP-10, MMP-11, 主要裂解 IV 型胶原,不能裂解 I 型胶原纤维。同时可降解蛋白多糖、纤维连接蛋白、层粘连蛋白。(4)基质溶解因子,即 MMP-7, MMP-26, 主要裂解 IV 型胶原,不能裂解 I 型胶原。(5)膜型 MMPs(MT-MMPs),即 MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25, 仅 MMP-14, MMP-16 可裂解 I 型胶原纤维。此外,少量的 MMPs 包括 MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-28, 不属于上述任何一组^[9-11]。

2 圆锥角膜中的 MMPs

2.1 MMP-1 的生理功能及圆锥角膜中的表达 MMP-1 主要在生理性和病理性的组织重塑过程中表达。正常成熟组织中, MMP-1 含量通常很低,而病理状态时,如损伤愈合、修复、重塑过程,其表达升高。MMP-1 可降解 I 型胶原、聚集蛋白聚糖、多能聚糖、基底膜蛋白聚糖、酪蛋白、巢蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、腱糖蛋白-C 等细胞外基质,可能在细胞外基质的生理性重塑方面起关键作用^[9]。正常角膜中,上皮细胞微弱表达 MMP-1;圆锥角膜中,表达 MMP-1 的上皮细胞比例增多,表达增强^[12],其活性也增加^[6]。圆锥角膜患者泪液中, MMP-1 含量增加^[13-14]。MMP-1 含量增加表明其可能参与了圆锥角膜变薄和前突的病理过程。

2.2 MMP-2 的生理功能及圆锥角膜中的表达 大部分人类组织组成型表达 MMP-2, 主要由成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞分泌。MMP-2 可降解的底物众多,包括细胞因子、生长因子、受体或结合因子,其活性受 TIMPs 调节,特别是 TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4^[9]。MMP-2 是角膜主要的基质金属蛋白酶,由角膜基质细胞合成和分泌,可水解 IV 型基底膜胶原,并通过攻击新合成的原纤维形成前的 I 型胶原,限制组织更新^[15]。圆锥角膜中 MMP-2 活性增加^[6],或者因为 MMP-2 蛋白过度表达^[15-17],或者因为 MMP-2 的 TIMP 配体合成率的变化^[17],导致圆锥角膜早期特征性的病理改变,即基质胶原板层数量减少、前弹力层纤维化、上皮基底膜断裂,因此推测 MMP-2 是角膜变薄的主要原因,并且这个病理过程可以被 TIMP-1 所阻断^[15]。但是另有研究表明圆锥角膜中 MMP-2 含量

并未改变^[1, 18]。圆锥角膜中 MMP-2 的含量研究的矛盾性结果可能是因为不同研究的圆锥角膜所处的不同病理阶段所致。

2.3 MMP-9 的生理功能及圆锥角膜中的表达 MMP-9 主要由免疫细胞分泌,诱导型表达,其底物特异性与 MMP-2 重叠,但是亲和力不同,主要是基底膜成分、细胞因子、生长因子、受体^[9]。角膜组织中, MMP-9 由角膜上皮产生。早期研究表明,圆锥角膜中 MMP-9 活性增加^[6]。圆锥角膜患者泪液中, MMP-9 酶原^[19-20]含量增高。另一些研究认为圆锥角膜中 MMP-9 没有变化^[16, 18]。MMP-9 不但可降解角膜成分,而且可以与细胞因子、生长因子等相互作用,共同促进圆锥角膜病情的进展。

2.4 MMP-13 的生理功能及圆锥角膜中的表达 MMP-13 在正常成熟组织中不表达或少量表达,而在发生组织修复或重塑过程的疾病中表达。MMP-13 优先降解 II 型胶原,降解 II 型胶原的能力是 MMP-1 的 5~10 倍,而降解 I 和 III 型胶原的能力较 MMP-1 低 5 倍,降解明胶的活性是 MMP-1 的 44 倍。MMP-13 也可降解 IV、IX、X 和 XIV 型胶原、纤维连接蛋白、聚集蛋白聚糖、结蹄组织生长因子、纤维蛋白原^[9]。角膜组织中, MMP-13 由角膜上皮细胞分泌,调节角膜损伤修复和重塑^[21]。早期研究表明,圆锥角膜中 MMP-13 活性增加^[6]。圆锥角膜患者泪液中, MMP-13 含量增加^[13, 16]。角膜曲率与圆锥角膜患者泪液中 MMP-13 含量呈正相关^[16]。角膜基质中的成份主要是 I 型胶原,因此, MMP-13 在圆锥角膜中的作用可能大于 MMP-1。

2.5 MMP-14 的生理功能及圆锥角膜中的表达 MMP-14 又叫膜型基质金属蛋白酶(MT1-MMP),具有蛋白水解能力,并可活化 MMP-2 和 MMP-13。其作用底物包括几乎所有细胞外基质成分,可降解 I、II、III 型胶原、纤维连接蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白 111 和 332、纤维蛋白和蛋白聚糖^[22]。人和实验动物组织损伤后, MMP-14 过度表达^[9]。MMP-14 在圆锥角膜中含量升高^[23-24]。MMP-14 通过激活 MMP-2 和直接降解来参与角膜基质降解。推测 MMP-14 可能在圆锥角膜发病起始过程中并不起作用。

2.6 其他 MMPs 的生理功能及圆锥角膜中的表达 MMP-3 在细胞外基质的更新过程中活化其他 MMPs 酶原,能有效地激活胶原酶、基质溶解因子和明胶酶 B,特别是对已经部分活化的 MMP-1 转化为完全活化的 MMP-1 起决定性作用。可裂解大部分细胞外基质蛋白,如 IV、V、IX 和 X 型胶原、蛋白聚糖、明胶、纤维连接蛋白、层粘连蛋白和原纤维蛋白-1,但不能降解 I 型胶原^[9]。MMP-7 可降解细胞外基质和基底膜蛋白,如纤维连接蛋白、IV 型胶原、层粘连蛋白、弹力蛋白、巢蛋白、软骨蛋白聚糖。此外,还可以降解明胶、I、III 和 V 型胶原,并能激活胶原酶^[9]。圆锥角膜患者泪液中, MMP-3, 7 含量增加^[13]。

3 圆锥角膜中的 TIMPs

基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 天然的内源性组织抑制剂,包括 TIMP-1, 2, 3 和 4^[6], 涉及 MMP 介导的细胞外基质的更新、组织重塑和细胞行为。TIMPs 对膜型 MMP 亲和力相对较低。生理状态下,大部分 TIMPs 是 MMPs 的广谱抑制剂,底物特异性差异较小。除抑制 MMP 外,

TIMPs具有多种生物学活性,包括细胞增殖、细胞移行和侵袭、抗血管生成、抗凋亡和突触可塑性等的调节^[9]。MMPs和TIMPs之间失衡影响角膜蛋白酶的活性,可能促使角膜变薄。

3.1 TIMP-1的生理功能及对圆锥角膜的影响 TIMP-1是可诱导蛋白,存在于正常角膜上皮和内皮的可溶性蛋白^[25],可阻止MMP-9酶原活化及TIMP-3诱导的角膜基质细胞凋亡,具有抗凋亡特性^[26],并抑制MMP-2的活性^[17]。TIMP-1和TIMP-3处于平衡状态,一旦失衡将促进圆锥角膜中角膜基质细胞的凋亡。因为TIMP-1抑制MMP-2活性,并抑制基质细胞凋亡,所以TIMP-1在起始修复过程,减轻圆锥角膜方面有重要作用。圆锥角膜患者泪液中TIMP-1含量与角膜曲率正相关^[16]。圆锥角膜中TIMP-1的表达高低,各研究结果互相矛盾。圆锥角膜中TIMP-1的mRNA水平降低^[23,27]。圆锥角膜基质细胞培养液中MMP-2/TIMP-1比例升高^[27]。晚期圆锥角膜基质细胞培养液中,TIMP-1合成降低^[28]。Kenney等^[27]研究证明圆锥角膜中TIMP-1含量的降低可导致角膜降解,同时发现圆锥角膜TIMP-1降低1.8倍。早期圆锥角膜TIMP不增加,这有助于MMP-2的活化,促进病情进展^[15]。另外一些研究得出相反的结论。圆锥角膜患者泪液中,TIMP-1含量增加^[13]。Kenney研究表明晚期圆锥角膜TIMP-1升高^[15,25]。

3.2 TIMP-2与圆锥角膜的关系 TIMP-2的表达不可诱导,存在于正常角膜上皮和前基质层,与MMP-2酶原形成复合体,阻止其活化^[15,17]。圆锥角膜患者泪液中TIMP-2含量与角膜曲率呈正相关^[16]。Kenney等^[25]研究表明晚期圆锥角膜TIMP-2升高。

4 MMPs与TIMPs的相互作用

正常状态下,角膜基质细胞可合成分泌MMPs,同时也分泌TIMPs。MMPs表达增高,可引起胶原的降解增多。TIMPs在多个环节抑制MMPs的活性,二者保持动态平衡,调节细胞外基质的稳定。MMPs与TIMPs的动态平衡和相互影响决定着细胞外基质的降解,MMPs主要由角膜基质成纤维细胞和角膜上皮细胞分泌,具有监督正常角膜功能的作用,催化降解角膜胶原。正常角膜中MMPs和TIMPs多以无活性的酶原形式存在。角膜受损后MMPs和TIMPs被激活,参与角膜基质胶原的重建过程,以便恢复角膜结构和组织功能。如果MMPs的活化调节失控,角膜即发生溶解溃疡或瘢痕形成。角膜细胞外基质MMPs的数量或活性,TIMPs的水平改变均可使细胞外胶原成分及代谢发生变化。

5 角膜交联对MMPs的影响

人角膜中,MMPs主要由上皮细胞、基质细胞和中性粒细胞分泌^[21]。CXL后,角膜上皮受损、角膜基质细胞凋亡、中性粒细胞聚集^[29],因此,MMPs的合成和分泌可能会出现变化。有少量文献报道了CXL后部分MMPs的变化。Mastropasqua等^[30]研究表明,人尸眼行角膜交联后即刻检测,10mW,9min离子导入组MMP-1表达增高,而3mW,30min离子导入组、标准去上皮交联组和对照组无变化,表明离子导入角膜交联(10mW,9min)可以显著激活角膜基质成纤维细胞,促进角膜重塑,重建正常角膜^[12]。标准CXL后第4d,患者泪液中MMP-13显著增加,38d时MMP-13浓度恢复到基线水平。在CXL前,介质浓度较低的患者中,交联后6mo,MMP-9,13和TIMP-1

浓度显著升高,而CXL后12mo时,仅MMP-13含量仍然是增高的。在CXL前,介质浓度较高的患者中,术后12mo时,MMP-9,13浓度降低^[13]。Balasubramanian等^[16]研究了CXL后3~6mo的患者泪液中MMPs含量,发现圆锥角膜CXL后泪液中大部分胶原酶和明胶酶含量和活性低于未CXL的圆锥角膜患者,高于正常对照组,但均无统计学意义。作者推测CXL可能积极地影响了圆锥角膜蛋白酶的活性和含量。但是作者没有检测CXL前圆锥角膜患者泪液中的MMPs,这有待于进一步研究。正常角膜、圆锥角膜和圆锥角膜交联后,泪液中活化的MMP-2,9没有差异^[16]。CXL后角膜基质中的MMPs动态变化尚无报道,有待研究。

6 小结

圆锥角膜的扩张和变薄是因为I型、IV型胶原及其他细胞外基质的减少^[31-32]。Abalian等^[32]研究了尾肽或胶原降解产物的含量,发现圆锥角膜内其含量是正常角膜的3.5倍,表明胶原发生降解。而胶原降解源于角膜基质细胞的凋亡和MMPs活化。圆锥角膜患者角膜和泪液中明胶酶和胶原酶活性增高^[21]。明胶酶可以降解变性的胶原,而胶原酶负责第一次损伤,引起胶原变性。圆锥角膜的胶原纤维排列松散,正常含量的明胶酶便可降解圆锥角膜的基质胶原^[16]。圆锥角膜是个进展缓慢的疾病,蛋白酶含量和活性的微小变化就可能影响病情进展。在圆锥角膜的病程中,MMP可能间断性过度表达,有时检测不到MMPs过度表达,因此文献报道可能出现互相矛盾的结果。

CXL术后角膜上皮受损,基质细胞发生凋亡、坏死、增殖和移行,使基质细胞从静止状态转变为激活状态。检测术后不同时期角膜组织中MMPs和TIMPs的含量及角膜组织的改变,探讨角膜交联术引起的MMPs和TIMPs的含量变化十分必要。角膜细胞、细胞外基质以及各种调节因子之间存在着复杂而精确的网络调控,以适应角膜发育、组织塑形等动态平衡的需要,目前这类复杂的调控机制还不明了,尚待进一步研究。

总之,MMPs在圆锥角膜的发生发展过程中起重要作用。CXL已经成为唯一能够延缓甚至阻止圆锥角膜病情进展的保守治疗方法,大大缓解角膜移植所需供体紧张的局面。CXL对角膜生物力学和结构的影响研究较多,而对MMPs的影响研究较少,进一步研究CXL后MMPs的变化有助于理解CXL后圆锥角膜的病理生理进程,以及CXL稳定圆锥角膜病情的作用机制。

参考文献

- 1 Wojcikl KA, Blasiak J, Szaflik J, et al. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Biochim Pol* 2014; 61(1): 55-62
- 2 Romero - Jimenez M, Santodomingo - Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye* 2010; 33(4):157-166
- 3 Meek KM, Tuft SJ, Huang Y, et al. Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(6): 1948-1956
- 4 Quantock AJ, Young RD. Development of the corneal stroma, and the collagen - proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn* 2008; 237(10): 2607-2621
- 5 Stabuc-Silih M, Ravnik-Glavac M, Glavac D, et al. Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus. *Mol Vis* 2009; 15: 2848-2860
- 6 Zhang Y, Mao X, Schwend T, et al. Resistance of corneal RFUVA-

cross-linked collagens and small leucine-rich proteoglycans to degradation by matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(2): 1014-1025

7 Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf* 2013; 11(2): 65-74

8 Nagase H. Metalloproteinases. *Curr Protoc Protein Sci* 2001; 21: 21-24

9 Shardella D, Fasciglione GF, Gioia M, et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med* 2012; 33(2): 119-208

10 曾昌洪, 邓应平. 基质金属蛋白酶在圆锥角膜发病机制中的作用. *眼科新进展* 2006; 26(8): 635-637

11 刘海霞, 张文华. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与角膜. *国外医学眼科学分册* 1999; 23(6): 361-367

12 Seppala HP, Maatta M, Rautia M, et al. EMMPRIN and MMP-1 in keratoconus. *Cornea* 2006; 25(3): 325-330

13 Kolozsvari BL, Berta A, Petrovski G, et al. Alterations of tear mediators in patients with keratoconus after corneal crosslinking associate with corneal changes. *PLoS One* 2013; 8(10): e76333

14 Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis* 2010; 16: 1949-1957

15 Smith VA, Matthews FJ, Majid MA, et al. Keratoconus: matrix metalloproteinase-2 activation and TIMP modulation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762(4): 431-439

16 Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, et al. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol* 2012; 90(4): e303-309

17 Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, et al. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Res* 2007; 84(6): 1125-1134

18 Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, et al. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(7): 1117-1124

19 Lema I, Duran JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology* 2005; 112(4): 654-659

20 Lema I, Sobrino T, Duran JA, et al. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(6):

820-824

21 Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom* 2013; 96(2): 214-218

22 Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for keratoconus? *Curr Eye Res* 2010; 35(3): 185-191

23 Cristina Kenney M, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye* 2003; 26(3): 139-146

24 Collier SA, Madigan MC, Penfold PL. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 in normal and keratoconus corneas. *Curr Eye Res* 2000; 21(2): 662-668

25 Kenney MC, Chwa M, Alba A, et al. Localization of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, gelatinase A and gelatinase B in pathological human corneas. *Curr Eye Res* 1998; 17(3): 238-246

26 Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998; 102(11): 2002-2010

27 Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas; evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3): 823-832

28 Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res* 2011; 92(4): 282-298

29 Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, et al. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea* 2007; 26(5): 600-605

30 Mastropasqua L, Lanzini M, Curcio C, et al. Structural modifications and tissue response after standard epi-off and iontophoretic corneal crosslinking with different irradiation procedures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(4): 2526-2533

31 Collier SA. Is the corneal degradation in keratoconus caused by matrix-metalloproteinases. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001; 29(6): 340-344

32 Abalain JH, Dossou H, Colin J, et al. Levels of collagen degradation products (telopeptides) in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea* 2000; 19(4): 474-476