

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**LOKALIZACE KOLAGENU TYPU VIII V NORMÁLNÍ A
PATOLOGICKÉ LIDSKÉ ROHOVCE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2007

Vypracovala: Mgr. Kateřina Zenklová

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.

Laboratoř biologie a patologie oka, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a
1. LF UK Praha a Oční tkáňová banka VFN a 1. LF UK Praha

Prohlašuji, že tato práce byla vypracovaná samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucí diplomové práce.

Lokalizace kolagenu VIII v normální a patologické lidské rohovce

Souhrn

Cíl: Cílem této práce bylo lokalizovat kolagen typu VIII v jednotlivých vrstvách rohovky a porovnat jeho výskyt v normálních a patologických rohovkách získaných od pacientů s Fuchsovou dystrofií, zadní polymorfni dystrofií rohovky a keratokonem.

Materiál a metody: Kolagen VIII byl detekován metodou nepřímé imunohistochemie na kryořezech získaných z kontrolních a patologických rohovek. Pro detekci byly použity i vzorky epitelu a endotelu rohovky získané otiskem na membrány Millicell. Metodou RT - PCR byl kontrolován výskyt kolagenu VIII v endotelu lidské aorty.

Výsledky: S protilátkou rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen od firmy COSMO BIO CO., LTD. se lokalizace kolagenu VIII v jednotlivých vrstvách rohovky lišila od lokalizace uváděné v literatuře. Navzdory předpokladům se kolagen VIII nacházel v epitelu, v Descemetově membráně byl u kontrolních rohovek přítomen jen ve třetině vzorků, u patologických rohovek dokonce jen v šestině případů. Metoda RT - PCR nepotvrdila oproti předpokladům výskyt kolagenu VIII v lidské aortě. Pomocí protilátky 9H3 anti $\alpha 1CVIII$ (získána od Dr. Greenhilla a Dr. Davise) byla pozitivita prokázána v Descemetově membráně a endotelu kontrolních i patologických rohovek, v epitelu rohovky pomocí této protilátky kolagen VIII detekován nebyl.

Závěr: Jediná ve světě komerčně dostupná protilátka neprokázala dostatečnou specifitu pro kolagen VIII. Protilátkou 9H3 anti $\alpha 1CVIII$ byl kolagen VIII v Descemetově membráně prokázán. Tuto protilátku je tedy možné použít pro detekci rozdílů v distribuci kolagenu VIII v normální a patologické lidské rohovce.

Klíčová slova: rohovka, kolagen VIII, Fuchsova dystrofie, zadní polymorfni dystrofie rohovky, keratokonus, nepřímá imunohistochemie

The localization of collagen VIII in normal and pathological human cornea

Summary (abstract)

Purpose: The aim of this work was to localize collagen type VIII in different layers of the cornea and to compare its localization in normal corneas with pathological corneas obtained from patients with Fuchs endothelial dystrophy, posterior polymorphous dystrophy or keratoconus.

Material and methods: Collagen VIII was detected using indirect immunohistochemistry on cryosections of control and pathological corneas. Imprints of endothelium and epithelium on Millicell membranes were also used. The presence of collagen VIII in the endothelium of human aorta was examined by RT - PCR.

Results: With the antibody rabbit IgG anti-mouse MAP type VIII Collagen from company COSMO BIO CO., LTD. the localization of collagen VIII in different layers of the cornea was different from that found in literature. Collagen VIII was detected in epithelium of all specimen. In Descemet's membrane of control corneas was collagen VIII present only in one third of all cases, in pathological corneas actually in one sixth of all cases. RT - PCR method did not confirm presence of collagen VIII in human aorta. Using the antibody 9H3 anti $\alpha 1CVIII$ (obtained from Dr. Greenhill and Dr. Davis) the positivity was evident in Descemet's membrane and endothelium of control and pathological corneas, in the epithelium was with this antibody no positivity detected. The different expression and localization was observed in control corneas and that obtained from patients suffered from Fuchs endothelial dystrophy or posterior polymorphous dystrophy.

Conclusion: The only commercially available antibody did not prove sufficient specificity for collagen type VIII. With use of the antibody 9H3 anti $\alpha 1CVIII$ was collagen VIII evidenced in the cornea. This antibody can be used for detection of differences in distribution of collagen VIII in normal and pathological human cornea.

Key words: cornea, collagen VIII, Fuchs dystrophy, posterior polymorphous dystrophy, keratoconus, indirect immunohistochemistry

1. Obsah

1. Obsah.....	5
2. Seznam zkratek.....	7
3. Úvod a cíle.....	8
4. Literární přehled	9
4.1. Anatomie u funkce rohovky.....	9
4.2. Kolageny.....	13
4.2.1. Vznik kolagenu.....	14
4.2.2. Kolageny v rohovce.....	15
4.2.3. Kolagen typu VIII.....	16
4.2.3.1. Struktura kolagenu VIII.....	17
4.3. Onemocnění rohovky související s poruchou kolagenů.....	19
4.3.1. Fuchsova dystrofie.....	20
4.3.1.1. Klinické projevy Fuchsovy dystrofie.....	20
4.3.1.2. Terapie Fuchsovy dystrofie.....	21
4.3.1.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách u pacientů s Fuchsovou dystrofií.....	21
4.3.2. Zadní polymorfní dystrofie rohovky.....	23
4.3.2.1. Klinické projevy zadní polymorfní dystrofie.....	23
4.3.2.2. Terapie zadní polymorfní dystrofie.....	24
4.3.2.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách u pacientů se zadní polymorfní dystrofií.....	24
4.3.3. Keratokonus.....	26
4.3.3.1. Klinické projevy keratokonu	26
4.3.3.2. Terapie keratokonu.....	27
4.3.3.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách u pacientů s keratokonem.....	27
5. Materiál a použité metody.....	29
5.1. Soubor kontrolních a patologických rohovek.....	29
5.2. Získání a zpracování vzorků.....	31
5.3. Nepřímá imunohistochemie.....	31
5.4. Protilátky proti kolagenu VIII.....	32

5.5. Zjištění pracovní koncentrace protilátky pro detekci kolagenu VIII v lidské rohovce.....	32
5.6. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen.....	33
5.6.1. Protokol - nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím UltraTech HRP (AEC) streptavidin-biotin peroxidázy.....	33
5.6.2. Protokol - nepřímá enzymová imunohistochemie s denaturací citrátem...33	
5.6.3. Protokol - nepřímá enzymová imunohistochemie s denaturací ureou.....	34
5.6.4. Protokol - nepřímá enzymová imunohistochemie na membránách Millicell	34
5.7. Použití protilátky 9H3 anti α 1CVIII.....	35
5.8. Hodnocení.....	35
5.9. RT – PCR.....	35
5.9.1. Protokol - PCR.....	36
6. Výsledky.....	40
6.1. Koncentrační řada.....	40
6.2. Nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen.....	42
6.2.1. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen u kontrolních rohovek.....	42
6.2.2. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen u pacientů s Fuchsovou dystrofií.....	45
6.2.3. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen u pacientů se zadní polymorfní dystrofií.....	46
6.2.4. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII u pacientů s keratokonem.....	47
6.3. Nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII membránách Millicell.....	48
6.4. Nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím protilátky 9H3 anti α 1CVIII	49
6.5. Polymerázová řetězová reakce.....	50
7. Diskuze.....	52
8. Závěr.....	54
9. Seznam použité literatury.....	55

2. Seznam použitých zkratek

AEC	3-amino-9-ethylkarbazol
BME	Bazální membrána epitelu
BSA	Bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
COL8A2	Gen pro řetězec $\alpha 2$ kolagenu VIII
DM	Descemetova membrána
ECM	Extracelulární matrix
FD	Fuchsova dystrofie
HRP	Horse-radish peroxidase, křenová peroxidáza
IHC	Imunohistochemie
KK	Keratokonus
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
OL	Oko levé
OP	Oko pravé
PAS	Periodic Acid Schiff, histologické barvení
PBS	Phosphate buffer saline, fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
SABC	Streptavidin-biotin-komplex
TBS	Roztok 0,05M Tris pufru a 0,9M NaCl v destilované vodě
TCF8	Gen pro transkripční faktor 8
UK	Univerzita Karlova
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
VSX1	Gen pro transkripční faktor visual system homeobox gene 1
ZPD	Zadní polymorfní dystrofie rohovky
1. LF	1. lékařská fakulta

3. Úvod a cíle

Rohovka je vysoce specializovaná tkáň s vysokým obsahem extracelulární matrix (ECM). Z hlediska funkčnosti rohovky je nezbytná její průhlednost, která je zajištěna právě složením a pravidelným uspořádáním jednotlivých komponent ECM. Největší podíl ECM rohovky je tvořen kolageny.

Změny na úrovni kolagenů jsou průvodním znakem a často i příčinou různých onemocnění. V této práci jsem se zaměřila na detekci změn kolagenu VIII ve zdravých rohovkách a rohovkách získaných od pacientů s Fuchsovou dystrofií, zadní polymorfni dystrofií rohovky a keratokonem. Tyto choroby se vyskytují poměrně často a mají značný klinický význam.

Syntézou, strukturou, výskytem a distribucí kolagenu v různých tkáních, i jeho funkcí v patologii různých onemocnění se zabývala celá řada prací. Ve zdravých rohovkách je kolagen VIII přítomen v endotelu a v Descemetově membráně, ve které tvoří hlavní strukturní složkou její hexagonální sítě vznikající v embryonálním stádiu. Jeho role zde není zcela prozkoumána.

Cílem této práce je :

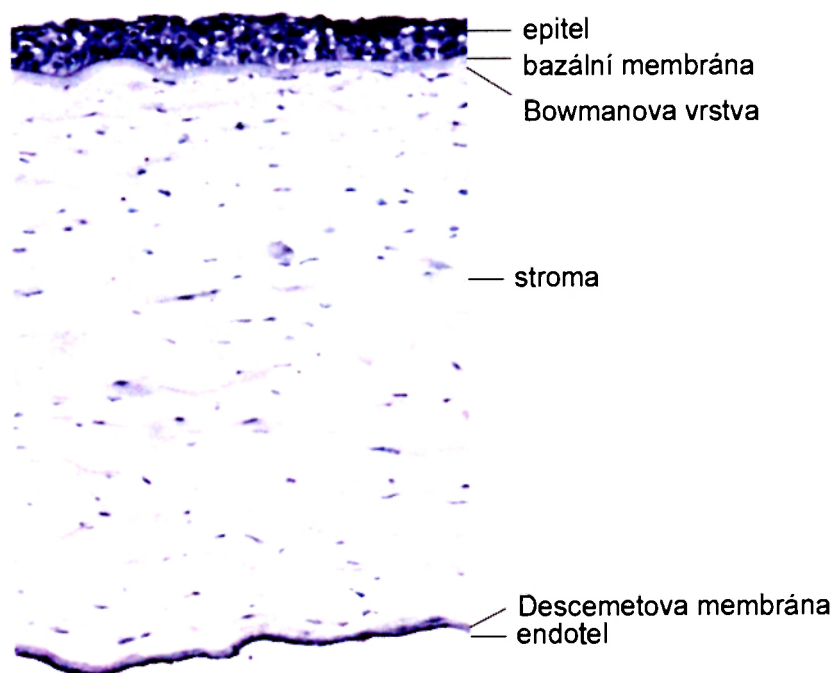
1. podat literární přehled o výskytu kolagenu VIII v rohovce
2. lokalizovat kolagen VIII v jednotlivých vrstvách kontrolní rohovky
3. lokalizovat výskyt kolagenu VIII v rohovkách pacientů s Fuchsovou dystrofií, zadní polymorfni dystrofií rohovky a keratokonem, a porovnat jej s výskytem ve zdravé tkáni.

4. Přehled literatury

4.1. Anatomie a funkce rohovky

Rohovka se skládá ze šesti vrstev (Obr. 1). Je to vysoce specifická tkáň, která láme a propouští světlo. Společně se sklérou tvoří pevný obal oka, který udržuje jeho tvar a poskytuje mu mechanickou ochranu i ochranu před vstupem infekce. Rohovka představuje přední šestinu tohoto obalu a je na rozdíl od skléry průhledná. Z vnější strany hraničí se vzduchem, z vnitřní s komorovou vodou. Má tvar horizontálně uložené elipsy se středovou tloušťkou 0,52 mm, směrem k periferii se ztlušťuje na asi 1 mm (Kraus, 1997). Zdravá rohovka je téměř avaskulární, je bohatě inervovaná většinou senzoryckými nervy pocházejícími z optické větve trigeminu (Nishida, 2005). Na povrchu rohovky je slzný film, který spolu s rohovkou tvoří dynamický systém (Rolando *et al.*, 2001).

Obr.1 Řez lidskou rohovkou (parafínový řez, barvení Harrisovým hematoxylinem)



Slzný film pokrývá epitel rohovky a spojivky ve vrstvě silné 7-10 μm a vytváří hladký povrch, který zlepšuje refrakci rohovky a umožňuje vznik ostrého obrazu na sítnici. Dále zajišťuje přísun kyslíku a živin pro povrchové vrstvy rohovky, zvlhčuje jeho povrch, zajišťuje hladké klouzání víček po povrchu rohovky a odstraňuje z něj bakterie a odloučené epitelové buňky (Rolando *et al.*, 2001).

Slzný film se skládá ze tří vrstev, které jsou produkovány různými typy žlázek v oblasti oční štěrbin. Zevní lipidová vrstva má tloušťku 0,1 μm a je secernovaná Meibomovými, Zeissovými a apokrinními Mollovými žlázami. Obsahuje volné mastné kyseliny, cholesterol, triglyceridy, sterolové estery, polarizované a nepolarizované lipidy. Tato vrstva zvyšuje povrchové napětí slzného filmu, zabraňuje přetékaní slz přes okraj víčka a ochraňuje povrch oka před rychlým odpařováním do okolního prostoru (Rolando *et al.*, 1985). Střední vodná vrstva tvoří 90 % objemu slz a zajišťuje zvlhčování a výživu rohovky (Pitrová, 2002). Obsahuje elektrolyty, minerály, enzymy a další proteiny. Na ochraně před vstupem infekčních agens se významně podílí lysozym a imunoglobuliny. Vodná vrstva vzniká sekrecí orbitální a palpebrální části slzné žlázy, dále pak sekrecí přídatných Krauseových a Wolfringových žláz. Vnitřní mukózní vrstva o tloušťce 0,02 – 0,05 μm se spojuje s normálně nesmáčivými mikrořasami rohovkových epitelálních buněk, vyrovnává nerovnosti rohovky a umožňuje tak přilnutí dalších vrstev slzného filmu. Vzniká sekrecí pohárkových buněk spojivky. Obsahuje komplex mukózního glykoproteinu, proteinových elektrolytů a buněčného materiálu. Snižuje povrchové napětí a změnou hydrofobního povrchu na hydrofilní přispívá k zachování intaktnosti slzného filmu (Pitrová, 2002).

Epitel je zevní vrstvou rohovky o tloušťce asi 50 μm . Skládá se z 5 – 7 vrstev buněk s dobrou a rychlou regenerační schopností v sedmi až čtrnáctidenním cyklu (Gipson, 1994). Vnitřní vrstvu tvoří vysoké cylindrické buňky, které se směrem k povrchu zakulacují a zevní vrstvu tvoří již velmi tenké ploché buňky. Buňky bazální vrstvy jsou schopny proliferace a obsahují více buněčných organel než buňky horních vrstev, které se z nich diferencují. Plně diferencované povrchové buňky se z povrchu oka odlupují a jsou odplavovány slzami. Zachování hladkého povrchu epitelu spolu se správnou funkcí slzného filmu je podstatnou součástí optického refrakčního systému oka. Epitel se také jako nejzevnější vrstva podílí na ochraně oka před mechanickým poškozením i před vstupem infekce. Kromě epitelálních buněk se v epitelu nacházejí Langerhansovy buňky. Jsou to dendritické antigen prezentující

buňky; jejich počet se zvyšuje od centra směrem k periférii a významně se podílejí na imunitní ochraně oka (Nishida, 2005).

Bazální membrána rohovkového epitelu (BME) je asi 50 nm silná a skládá se hlavně z kolagenu IV, lamininu, fibronektinu, kolagenu VII, fibrinu a proteoglykanů, produkoványými buňkami epitelu. Pomocí hemidesmozomů jsou zde zakotveny buňky epitelu. Bazální membrána hraje roli při hojení epitelu, udržuje polaritu epitelových buněk a je nezbytná pro zachování funkce epitelu (Gibson, 1994, Nishida, 2005).

Bowmanova vrstva je asi 12 μm silná nebuněčná vrstva kolagenních fibril a proteoglykanů. Z kolagenů jsou zde zastoupeny především typ I a III, dále pak typ VII podílející se na ukotvení bazálních buněk epitelu. V současnosti je považována za přední vrstvu stromatu. Její funkce není zcela jasná. Uvažuje se o ní jako o potřebné bariéře mezi buňkami stromatu a epitelu, která zároveň slouží jako podpora pro jeho správnou funkčnost. Bylo však prokázáno, že se epitel může regenerovat i v případě, že Bowmanova vrstva chybí (Gibson, 1994, Nishida, 2005).

Stroma je nesilnější vrstvou rohovky. Jeho tloušťka je kolem 500 μm , tvoří tedy více než 90 % její celkové tloušťky. Stroma je složeno z extracelulární matrix produkované keratocyty (stromální fibroblasty). Pro svou vysoce specifickou organizovanost a průhlednost je stroma považováno za unikátní pojivovou tkáň. Buněčná složka tvoří jen asi 2 – 3 % z celkového objemu stromatu, zbytek připadá na složky mezibuněčné hmoty, kolageny (především typu I, III, IV, V a VI) a glykosaminoglykany. Hlavním glykosaminoglykanem rohovky je keratan sulfát, dále pak chondroitin sulfát a dermatan sulfát (Nishida, 2005). Glykosaminoglykany jsou součástí proteoglykanů, skládajících se z proteinového jádra a glykosaminoglykanů, poloysacharidových řetězců složených z disacharidových jednotek. Uvedené glykosaminoglykany mají schopnost vázat a zadržovat velké množství vody, za fyziologických podmínek jí stroma obsahuje asi 80 %. K zachování hydratace je bezpodmínečně nutná integrita a funkčnost endotelu bránící před prosakováním komorové tekutiny do stromatu a tím před vznikem edému a následným zákalem rohovky. Kolagenní fibrily jsou shodné tloušťky (asi 30 nm) a vzdálenost mezi nimi se neliší o víc než 42 nm. Kolagenní fibrily vytváří ve stromatu kolem 300 paralelně uspořádaných lamel (Hamada *et al.*, 1972, Meek and Boote, 2004). Toto pravidelné uspořádání je hlavním důvodem rohovkové transparency a zabezpečuje to, že stromatem pronikající světelné paprsky nejsou ve svém průběhu ovlivňovány.

Descemetova membrána (DM) je bazální membránou rohovkového endotelu a je produkována jeho buňkami. Je tvořena především kolagenem typu IV, VIII, lamininem a fibronektinem (Ljubimov *et al.*, 1995). Obsahuje elastická vlákna, která jí dávají pružnost. Je velmi odolná vůči vstupu infekce do vnitřní části oka i mechanickému poškození. V elektronovém mikroskopu můžeme odlišit dvě části Descemetovy membrány. Přední, pruhovaná (anterior banded layer), zaujímá tenčí část membrány (asi 3 - 4 μm). Formuje se již během intrauterinního vývoje a v průběhu života se její tloušťka ani struktura nemění. Obsahuje především vlákna kolagenu typu VIII, která jsou uspořádána do hexagonální sítě (Sawada *et al.*, 1990). Zadní část membrány je amorfní (posterior non-banded layer) a podobné jako ostatní bazální membrány je tvořena především kolagenem IV. V průběhu života je kontinuálně produkována a její tloušťka se s věkem zvyšuje, v 10 letech je tlustá přibližně 2 μm , v 80 letech asi 10 μm (Gibson, 1994).

Endotel tvoří jedna vrstva pravidelně uspořádaných, většinou hexagonálních buněk o tloušťce asi 5 μm . Densita endotelových buněk je po narození 6000/mm². Po narození dochází k zástavě proliferace těchto buněk. K obnově celistvosti endotelu (ročně odumírá asi 0,6% buněk) dochází posunováním okolních buněk na místo poškození a jejich rozprostíráním (Bourne *et al.*, 1997). Přední povrch buněk endotelu je hladký a navazuje na Descemetovu membránu. Zadní povrch tvoří záhyby, které vyčnívají do přední komory; maximalizuje se tak plocha, která je v kontaktu s komorovou tekutinou. Hlavní role endotelu spočívá v odčerpávání vody ze stromatu, a tím udržování jeho transparence. Tekutina, která pasivně proniká do stromatu z přední komory vlivem negativního stromálního tlaku, je odčerpávána zpět souhrou řady pasivních i aktivních mechanismů (Bonanno, 2003). Při poklesu denzity endotelu pod 1000 buněk/mm² dochází ke ztrátě funkčnosti endotelu, hydrataci stromatu a zákalu rohovky.

4.2. Kolageny

Kolageny představují širokou skupinu živočišných bílkovin, tvoří třetinu celkové bílkovinné hmoty obratlovců. Biologický význam těchto strukturálních proteinů spočívá ve vytváření hlavní organické složky podpůrného systému organismů; kostí, šlach, chrupavek, vaziva, kůže. Kolageny jsou i významnou složkou cévních stěn a bazálních membrán. Jedná se o skupinu různorodou, jejich společným znakem je struktura trojšroubovice, kterou vytvářejí, a jejich lokalizace v extracelulární matrix. V současnosti rozeznáváme 27 různých typů (I – XXVII) kolagenů (Prockop a Kivirikko, 1995), lišících se strukturou i funkcí (Tab.1).

Tab. 1 Přehled kolagenů s nejčastějším výskytem, zastoupení jejich řetězců a lokalizace (zpracováno dle Myllyharju a Kivirikka, 2001).

Typ	Složení	Výskyt a funkce
I.	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	kůže, šlachy, kosti, plíce, aorta
II.	$[\alpha 1(II)]_3$	hyalinní chrupavka
III.	$[\alpha 1(III)]_3$	kůže, šlachy, plíce, aorta
IV.	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	bazální membrány, často společně s I
V.	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	novotvary
VI.	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	intersticiální tkáň
VII.	$[\alpha 1(VII)]_3$	epitel
VIII.	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	některé buňky endotelu, cévy
IX.	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	spolu s typem II v chrupavkách součást hypertrofujících a mineralizujících chrupavek
X.	$[\alpha 1(X)]_3$	chrupavka
XI.	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	chrupavka
XII.	$[\alpha 1(XII)]_3$	vyskytuje se společně s typy I a III
XIII.	$[\alpha 1(XIII)]_3$	různé tkáně
XIV.	$[\alpha 1(XIV)]_3$	v mnohých tkáních společně s I
XV.	$[\alpha 1(XV)]_3$	bazální membrány
XVI.	$[\alpha 1(XVI)]_3$	různé tkáně
XVII.	$[\alpha 1(XVII)]_3$	hemidesmozomy v kůži
XVIII.	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	bazální membrány
XIX.	$[\alpha 1(XIX)]_3$	bazální membrány

Na základě supramolekulárního uspořádání můžeme kolageny rozdělit do několika skupin (podle Prockopa a Kivirikka, 1995 a Ihanamákiho *et al.*, 2004))

- kolageny tvořící fibrily: I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII,
- kolageny tvořící síť: IV, VIII, X,
- kolageny filamentární: VI,
- kolageny FACIT (kolageny asociované s fibrilami s přerušením trojšroubovice): IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI ,
- kolageny tvořící kotvící fibrily: VII,
- kolageny s transmembránovou doménou: XIII, XVII, XXIII, XXV,
- kolageny obsahující endostatin: XV, XVIII,
- kolageny s neznámým výskytem nebo uspořádáním: XXII, XXVI.

Stejně jako ostatní bílkoviny jsou kolageny tvořeny aminokyselinami, specifická struktura kolagenu závisí na uspořádání aminokyselinových zbytků v primární struktuře polypeptidických řetězců. Charakteristickým znakem jejich primární struktury je aminokyselina glycin, která se opakuje v sekvenci Gly-X-Y, kde X představuje nejčastěji alanin nebo prolin a Y hydroxyprolin (Ihanamáki *et al.*, 2004) To podmiňuje jejich prostorovou strukturu.

Biochemickými analýzami bylo zjištěno, že dominantním typem u člověka i u ostatních savců je kolagen typu I. Ten je také přítomen téměř ve všech strukturách oka. Dále jsou zde významně zastoupeny kolagen typu III (více než 10%), V (asi 5%) a VI (Marshall *et al.*, 1993).

4.2.1. Vznik kolagenu

Kolagenové molekuly jsou syntetizovány v drsném endoplazmatickém retikulu jako jednoduché pro-alfa řetězce. Ty jsou kódovány jednotlivými geny. V drsném endoplazmatickém retikulu dochází za přítomnosti řady enzymů k post-translačním modifikacím, jako jsou hydroxylace prolinu a lysinu a glykosylace hydroxyprolinu (Michelacci, 2003). Těmito úpravami dochází k prodlužování řetězců a vytváření stabilních vazeb mezi jednotlivými řetězci. Vždy tři pro-alfa řetězce se v buňce spojují do levotočivé trojšroubovice, označované jako prokolagen. Základním předpokladem vzniku trojšroubovice je glycin, který je každou třetí aminokyselinou v řetězci (Kadler *et*

al., 1996). U některých typů kolagenu jsou všechny α řetězce identické, u některých je molekula tvořena dvěma až třemi různými řetězci (Marshall *et al.*, 1993).

Prokolagen je buňkami sekretován do cytoplazmy, kde dochází k enzymatickému odštěpení C – terminálního a N – terminálního peptidu a vzniku zralého funkčního kolagenu (Prockop and Kivirikko, 1995). Molekula získává schopnost agregovat do kolagenních fibril o průměru 10 - 300 nm, ty pak tvoří jednotlivá kolagenní vlákna o průměru 0,5 – 3 μ m a délce až několik milimetrů (Nishida, 2004).

4.2.2. Kolageny v rohovce

V rohovce se kolagen nachází ve velkém množství, tvoří asi 70 % její suché hmotnosti. Patří tedy k nejvýznamnějším složkám extracelulární matrix rohovky. V rohovce se kolageny nacházejí především ve stromatu a bazálních membránách: BME a DM.

Tab. 2 Přehled výskytu kolagenů v rohovce (zpracováno dle Marshalla *et al.*, 1993).

Rohovka	Typ kolagenu
Embryogeneze	I, II, IV, V, VI, VIII, IX
Bazální membrána	IV, VI, VII
Bowmanova vrstva	I, III, VII
Stroma	I, III, V, VI
Descemetova membrána	IV, VI, VIII

Stroma a Bowmanova vrstva

Ve stromatu byly imunohistochemicky (světelnou i elektronovou mikroskopií) detekovány kolageny I, III, V a VI. První tři typy se vyskytují společně ve stromálních fibrilách, typ VI se nachází v mezifibrilární hmotě. Nejvíce je zastoupen kolagen I ve formě těsně uspořádaných a vysoce organizovaných fibril, což dává stromatu pevnost v tahu. Kolagen III je zastoupen jen v menším množství, ale s rostoucím věkem může jeho obsah stoupat a podílet se na vzniku různých patologických stavů (Michelacci, 2003). Kolagenní fibrily ve stromatu mají jednotný průměr (22,5 – 35 nm) a vzdálenost mezi jednotlivými vlákny je pravidelná ($41,4 \pm 0,5$ nm), orientace i vzdálenost kolagenních vláken je významně regulována vazbou na proteoglykany (zejména keratan sulfát, dále dermatan sulfát, chondroitin sulfát). Jejich význam spočívá ve

schopnosti vázat a zadržovat velké množství vody, tím se podílejí na hydrataci stromatu a udržování pravidelné vzdálenosti mezi kolagenními vlákny (Meek and Boote, 2004).

Přední část stromatu je tvořena bezbuněčnou Bowmanovou vrstvou, která je tvořena především kolageny typu I a III. Je zde přítomen i kolagen VII, který tvoří ukotvovací vlákna mezi hemidesmozomy a ukotvujícími plaky ve stromatu (Gibson *et al.*, 1987).

Bazální membrána epitelu

Důležitou roli hrají kolageny v bazální membráně epitelu. Buňky epitelu jsou ukotveny k bazální membráně. Na ukotvení se podílí zejména kolagen typu VII ve formě kotvících fibril. V BME se dále nachází kolagen VI který tvoří síťovou strukturu (Marshall *et al.*, 1993).

Descemetova membrána a endotel

V přední části DM se nachází kolagen VIII. Ten je hlavní strukturální složkou hexagonální sítě DM, která vzniká již v embryonálním stádiu (Sawada *et al.*, 1990). Jeho role není zatím zcela prozkoumána. Je možné, že poskytuje strukturální oporu před tlakem komorové vody z přední komory. V oblasti amorfní části DM přiléhající k endotelu byl lokalizován kolagen typu IV. Dále byly mezi zadní vrstvou a nejzadnější lamelou objeveny typy V a VI, které by zde mohli plnit funkci spojení Descemetovy membrány a rohovkového stromatu (Marshall *et al.*, 1993). V buňkách endotelu byl detekován kolagen VIII (Gottsch *et al.*, 2005a).

4.2.3. Kolagen VIII

Kolagen typu VIII je nefibrilární kolagen s krátkým řetězcem, který byl prvně identifikován v roce 1980 jako produkt endotelových buněk hovězí aorty, proto byl původně označován jako endoteliální kolagen (Shuttleworth, 1997). Následně bylo prokázáno, že tento typ kolagenu je produkován různými buňkami endotelu, lidskými fibroblasty, byl pozorován v mozkových plenách, míše, optickém nervu, periosteu a perichondriu, je také produkován některými nádorovými buňkami. Vyskytuje se běžně v zárodečných tkáních, zejména v těch s hojným cévním zastoupením.

Často se vyskytuje v bazálních membránách, zejména v subendoteliálních. Stále však není jasný jeho vztah ke kolagenu IV a dalším složkám bazálních membrán. V bazální lamině buněk hladkého svalstva jeho přítomnost významně ovlivňuje fenotyp

těchto buněk (Shuttleworth, 1997). Má vliv na migraci buněk hladkého svalstva jako následek po cévních poraněních. Hraje důležitou roli v procesu angiogeneze a remodelace tkání. Má vztah k mikrofibrilám elastických tkání, i když není přímo jejich součástí ani součástí elastických vláken. Není však jasné, jestli ve všech těchto případech je totožné supramolekulární uspořádání tohoto kolagenu.

Významná je jeho role v embryogenezi rohovky. Pruhovaná vlákna přední vrstvy DM, která se tvoří zárodečně od čtvrtého měsíce života plodu, jsou tvořena především kolagenem typu VIII. Po narození dochází k utlumení syntézy kolagenu VIII buňkami endotelu, ty jsou následně přeorientovány na syntézu kolagenu typu IV, který utváří zadní nepruhovanou vrstvu DM (Murray *et al.*, 1993).

4.2.3.1. Struktura kolagenu VIII

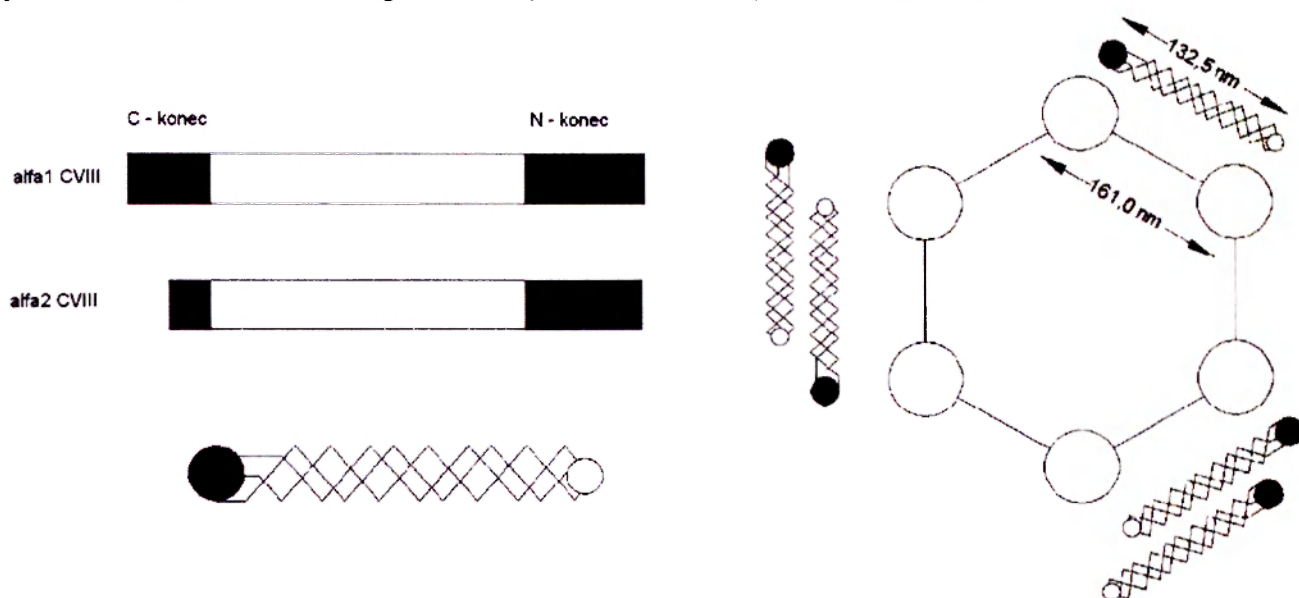
Kolagen VIII se skládá ze dvou různých α -řetězců o podobné molekulové hmotnosti (60 000). Jednotlivé řetězce jsou kódovány geny, gen COL8A1 pro řetězec $\alpha 1$ a COL8A2 pro řetězec $\alpha 2$. Spolu s kolageny typu IV a X patří do skupiny kolagenů tvořící síť. Síť je tvořena vrcholovými, v elektronové mikroskopii patrnými uzly navzájem spojenými tyčovitými útvary. Experimenty *in vitro* bylo zjištěno, že jednotlivé části ve tvaru činky jsou 160 nm dlouhé, vzájemně adherují na zakulacených koncích a tak tvoří šestiúhelníkové útvary (Sawada *et al.*, 1990). V DM tvoří tyto útvary několik vrstev uspořádaných paralelně s povrchem membrány. Struktura hexagonální sítě zaručuje DM odolnost vůči vnějšímu tlaku i tlaku komorové tekutiny z přední komory. Toto supramolekulární uspořádání vytváří kolagen VIII nejen v DM, v ní je však pomocí elektronového mikroskopu velmi dobře viditelné a popsáno (Brown and Timpl, 1995).

Některými svými vlastnostmi se kolagen VIII odlišuje od ostatních typů kolagenů. Je to hlavně vyšší citlivost vůči pepsinu, sekrece za nepřítomnosti prolyl nebo lysyl hydroxylace a malé množství disulfidických vazeb mezi řetězci (Sage *et al.*, 1983).

Podle několika prací zabývajících se studiem kolagenu VIII, vytváří molekulu s heterotrimerickou strukturou ze dvou $\alpha 1$ a jednoho $\alpha 2$ řetězce označovanou jako $[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$ (Shuttleworth, 1997, Brown and Timpl, 1995). Greenhill a kol. však zveřejnili práci, ve které detekovali jednotlivé $\alpha 1$ a $\alpha 2$ řetězce a jejich výskyt nebyl jednotný v různých typech tkání, například v rohovce, aortě a optickém nervu. Domnívají se, že kolagen VIII se nachází i v uspořádání $[\alpha 1(\text{VIII})]_3$ a $[\alpha 2(\text{VIII})]_3$ (Greenhill *et al.*, 2000).

Obr. 2 ukazuje předpokládanou strukturu řetězců α_1 a α_2 v kolagenu VIII i s přibližnými velikostmi jednotlivých komponent hexagonální sítě v Descemetově membráně. Na obou koncích se nacházejí nekolagenní zbytky (Kapoor *et al.*, 1988), na obrázku jsou vyznačeny tmavě.

Obr. 2 Struktura kolagenu VIII (zpracováno dle Shuttlewortha, 1997). Vlevo jsou jednotlivé řetězce α_1 a α_2 , dole obrázek trojšroubovice, do které se skládají. Jednotlivé trojšroubovice pak tvoří hexagonální uspořádání v DM (obrázek vpravo).



4.3. Onemocnění rohovky související s poruchou kolagenů

Změny na úrovni produkce strukturálně defektního kolagenu nebo snížené produkce kolagenů byly zaznamenány u řady onemocnění a často mohou být i jejich příčinou. U některých onemocnění bývá postižení rohovky jediným znakem choroby, většinou se však jedná a postižení více orgánů. Příkladem onemocnění, které vzniká na podkladě mutace genu kódujícího kolagen, je Fuchsova dystrofie (Gottsch *et al.*, 2005b). Genová mutace vede ke změně pořadí aminokyselin v $\alpha 2(VIII)$ řetězci, to má vliv na tvorbu intramolekulárních vazeb a tím i na celkovou strukturu proteinu.

Mutace v tomto genu byly detekovány také u dvou pacientů se zadní polymorfní dystrofií (Biswas *et al.*, 2001). Dále byl v patologickém endotelu rohovek získaných od pacientů se zadní polymorfní dystrofií popsán ektopický výskyt $\alpha 3$ řetězce kolagenu IV, podmíněném mutacemi v genu pro transkripční faktor TCF8 (Krafchak *et al.*, 2005).

U keratokonu, jednoho z nejčastěji se vyskytujících očních onemocnění, byly zjištěny abnormality v organizaci stromálních lamel s nerovnoměrnou distribucí kolagenních vláken. Ve srovnání s normální rohovkou bylo zaznamenáno snížení výskytu kolagenu IV (Kenney *et al.*, 1997).

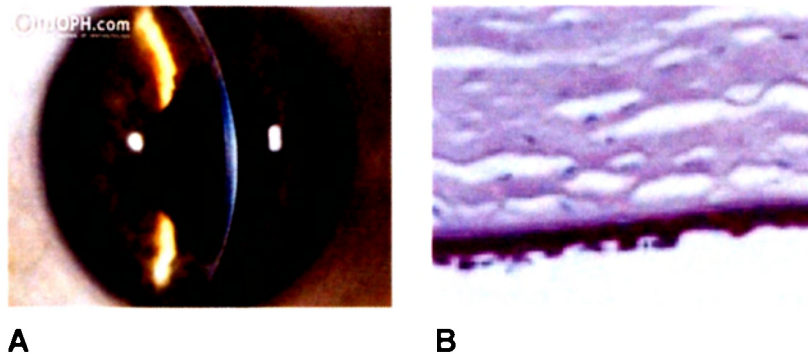
Změny extracelulární rohovkové matrix, včetně ektopické akumulace některých řetězců kolagenu IV byla prokázány i u fakické a afakické bulózní keratopatie jako součást postupující fibrózy (Ljubimov *et al.*, 1996)

Další dědičné choroby, jejichž následkem je tvorba abnormálního kolagenu jsou například osteogenesis imperfecta, Ehlersův – Danlosův syndrom nebo Alportův syndrom (Kivirikko, 1993).

4.3.1. Fuchsova dystrofie

Fuchsova dystrofie (FD) je časté oboustranné postižení rohovky, které je indikováno většinou mezi 40. a 50. rokem života. Jeho dědičnost není jednoznačně stanovena, byl však popsán autozomálně dominantní přenos. Třikrát až čtyřikrát častěji se toto onemocnění vyskytuje u žen než u mužů. Charakteristická je pro toto onemocnění tvorba gut, drobných prominencí DM směrem do přední komory oka (Obr. 2). U FD byly popsány mutace pro řetězec $\alpha 2$ kolagenu VIII (COL8A2) (Biswas *et al.*, 2001). Rozlišujeme dva typy Fuchsovy dystrofie – s manifestací v raném a pozdním věku (Gottsch *et al.*, 2005a).

Obr. 3 Fuchsova dystrofie, A - na štěrbínové lampě. B - řez rohovkou (barvení PAS), zobrazeno stroma, DM a endotel s charakteristickými gutami (zdroj: <http://www.altasophthalmology.com>)



4.3.1.1. Klinické projevy Fuchsovy dystrofie

Klinicky se FD projevuje v několika fázích. V první fázi je pacient asymptomatický, ale v zadní části rohovky se objevuje pigmentace, Descemetova membrána je matná a ztlustělá, zraková ostrost zůstává zachovaná. V druhé fázi již pacient vidí zamlženě a rozmazaně (Weisenthal *et al.*, 2005). Progredující dystrofie vede k postupné dekompenzaci endotelu a stromálnímu i epitelovému edému rohovky. Ten se nejdříve objevuje v podobě malých, čirých cyst, postupně se zdrsňuje jejich povrch a zvětšují se. Vznikají buly které mohou praskat a působit pacientovi bolest (Bergmanson *et al.*, 1999). Dochází k centrálnímu ztlušťování rohovky což vede ke zhoršení vizu, nejprve ráno po probuzení, později zhoršené vidění přetrvává po celý

den. Ve třetí fázi ustupuje edém epitelu, nedochází již k praskání bul. Pacient se cítí lépe, neobtěžuje ho bolest, vizus je však velmi špatný a citlivost rohovky je snižená. Stav často komplikují zvýšený nitrooční tlak, periferní neovaskularizace a epitelové eroze.

Onemocnění s charakteristickou tvorbou gut bez progrese se označuje jako cornea guttata a je považováno spíše za degeneraci (Kraus, 1997, Krachmer, 1985).

4.3.1.2. Terapie Fuchsovy dystrofie

Pacienti s raným stádiem FD bývají sledováni kvůli případné progresi onemocnění, obvykle bez nutnosti léčby. V dalších stádiích, kdy dochází pro nedostatečnou funkci endotelu k edému, je terapie nezbytná. Konzervativní léčba v podobě aplikace hypertonického roztoku (5% roztok NaCl) se podává v případě menšího epiteliálního edému. Dále se doporučuje aplikace horkého vzduchu (z horkovzdušného fénu), a to zejména po ránu, kdy je edém největší (Weisenthal *et al.*, 2005). Pro zmírnění bolesti způsobené praskáním epiteliálních bul se pacientům aplikují měkké hydrogelové kontaktní čočky a vysokým obsahem vody. Praskající buly způsobují jizvení rohovky, pacientovi hrozí sekundární infekce, dochází k velkému zhoršení zrakové ostrosti a přetrvávajícím bolestem (Weisenthal *et al.*, 2005). Pokud je symptomatická léčba neúspěšná, indikuje perforující či zadní lamelární keratoplastika (Brady *et al.*, 1989). Další léčba se pak odvíjí od přidružených komplikací.

4.3.1.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách pacientů s Fuchsovou dystrofií

Patologicky změněné endotelové buňky produkují zvýšené množství extracelulární matrix abnormálního složení (Levy *et al.*, 1995). Mezi endotelem a zadní pruhovanou vrstvou DM se vytváří patologická fibrilární vrstva, zadní kolagenní vrstva, která způsobuje ztlustění DM (Gottsch *et al.*, 2005a). Ta se skládá z pruhovaných vláken (100 nm) orientovaných do různých směrů, strukturou podobných těm v přední vrstvě membrány. Mezi nimi jsou roztroušené chomáče tvořené "wide spaced" kolagenem (Adamis *et al.*, 1993). Vznikající patologická DM má tloušťku 4 – 5 µm, celkově pak 8 – 10 µm, u některých pacientů i 20 µm. Přední pruhovaná vrstva má normální tloušťku i pruhování. Zadní nepruhovaná vrstva vykazuje spíše ztenčení a může i úplně

chybět. Tato vrstva se vychlipuje ve formě gut, které mohou mít nejrůznější tvar (houbovitý, kulovitý). Ukládání patologické zadní kolagenní vrstvy je masivnější u FD s raným výskytem, kdy depozita vznikají již během fetálního vývoje (Gottsche *et al.*, 2005a). Změny v DM jsou dobře patrné ve světelné i v elektronové mikroskopii (Weisenthal *et al.*, 2005).

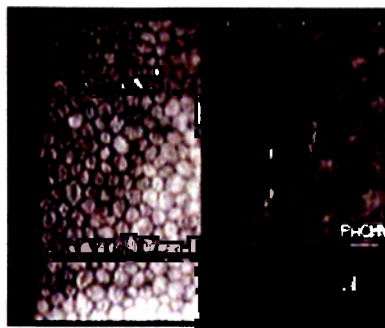
Pravděpodobně na základě interakcí mezi patologickými buňkami endotelu a extracelulární matrix DM dochází k deformaci endotelu, buňky se zmenšují a mění se jejich původně hexagonální tvar na polymorfní (Bergmanson *et al.*, 1999).

Nad prominencemi Descemetovy membrány se endotelové buňky ztenčují a přestávají souvisle krýt zadní plochu rohovky. Vznikající mezery se organismus snaží vyplnit zvětšováním zbývajících buněk. Pokles hustoty pod 1000 buněk/mm² je kritická hodnota, při které se začíná tvořit edém (Adamis *et al.*, 1993).

4.3.2. Zadní polymorfni dystrofie rohovky

Je to oboustranné, pomalu progredující onemocnění, které se prvně projevuje nejčastěji ve 3. až 5. dekádě života. Postihuje častěji ženy než muže, dědičnost je autozomálně dominantní (Cibis *et al.*, 1977). Obvykle se objevuje bilaterálně, někdy asymetricky. Má relativně příznivou prognózu, často je to onemocnění stabilní a bez symptomů. Podle dostupných údajů se ve světě vyskytuje asi 300 pacientů s touto chorobou, z toho téměř polovina v České republice, a to zejména v oblasti Klatov v západních Čechách (Kraus, 1997). U českých pacientů se většinou nejedná o nezávažné onemocnění (Gwilliam *et al.*, 2005).

Obr. 4 Zadní polymorfni dystrofie rohovky, v zrcadlovém mikroskopu, vlevo endotel kontrolní rohovky s pravidelně uspořádanými endotelovými buňkami, vpravo ZPD se zvětšenými polygonálními buňkami.



4.3.2.1. Klinické projevy zadní polymorfni dystrofie

Prvním příznakem tohoto onemocnění bývá nejčastěji snížená zraková ostrost, u některých pacientů však zůstává zachována. Méně často je prvním příznakem bolest, později se objevuje edém rohovky, jehož trvání je úměrné závažnosti patologických změn.

Klinický obraz této dystrofie se projevuje vznikem drobných okrouhlých nebo oválných ložisek s šedavým halo na úrovni endotelu a Descemetovy membrány, které pozorujeme na šterbinové lampě. Tento typ označujeme jako ložiskový. Druhý typ - geografický, se projevuje jako rozsáhlejší nepravidelné plochy abnormálního endotelu. V některých případech nejsou biomikroskopicky patrné žádné změny, zjišťujeme je zrcadlovou mikroskopií endotelu (Obr. 4). V takovém případě se jedná o celulární typ.

U části pacientů jsou tyto změny provázeny plošným zašednutím DM, edémem rohovky, iridokorneálními periferními adhezemi, atrofií stromatu duhovky a ektropiemi pigmentového listu duhovky (Kraus, 1997). Edém rohovky je přítomen u 30 – 50 % pacientů a sekundární glaukom u zhruba 20 % pacientů. Při pozorování v odraženém světle jsou léze 0,1 – 1 mm velké, ostře ohraničené oblasti s lehce ztlustělými okraji, nebo se jeví jako tmavá místa narušující endotelovou mozaiku. Mohou obsahovat shluky buněk. Někdy jsou popisovány jako prohloubeniny DM, vyplněné fibrilárním nebo kolagenním materiálem (Weisenthal *et al.*, 2005). Endotelové buňky obklopující léze mohou být normální nebo menší velikosti, nahloučené k sobě, nejčastěji však zvětšené, pleomorfní.

4.3.2.2. Terapie zadní polymorfni dystrofie

Léčba je u řady pacientů symptomatická. Důvodem pravidelného sledování pacienta je zvýšený nitrooční tlak. Ke zvýšení nitroočního tlaku dochází patrně v důsledku přerůstání abnormálních buněk epitelu přes komorový úhel. Při nedostatečné kompenzaci vysokého nitroočního tlaku léky přichází na řadu trabekulektomie, případně transplantace rohovky (Weisenthal *et al.*, 2005).

4.3.2.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách pacientů se zadní polymorfni dystrofií

ZPD může být asociována s několika mutacemi. První popsanou mutací byla mutace genu VSX1 na 20. chromozómu v oblasti p11 – q11 (Héon *et al.*, 1995). Dále byly detekovány mutace genu kódujícího $\alpha 2$ řetězec kolagenu VIII (COL8A2) (Biswas *et al.*, 2001). U jednoho pacienta byl popsán ektopický výskyt $\alpha 3$ řetězce kolagenu IV, snad podmíněný mutacemi v genu pro transkripční faktor TCF8 (nově označovaný jako ZEB1) (Krafchak *et al.*, 2005).

Histopatologicky je základním znakem zadní polymorfni dystrofie epitelizace endotelových buněk. Abnormální endotel tvoří v okrscích vrstvu složenou až ze šesti řad buněk, na jejich povrchu jsou mikroklky, mají spojení typu desmozomů a cytoplazmatická cytokeratinová filamenta (Krachmer, 1985). Proces epitelizace pravděpodobně spočívá v postupné přeměně původně endotelových buněk za účasti změněné DM. Zatím není objasněno, co je příčinou vzniku těchto buněk. Kromě

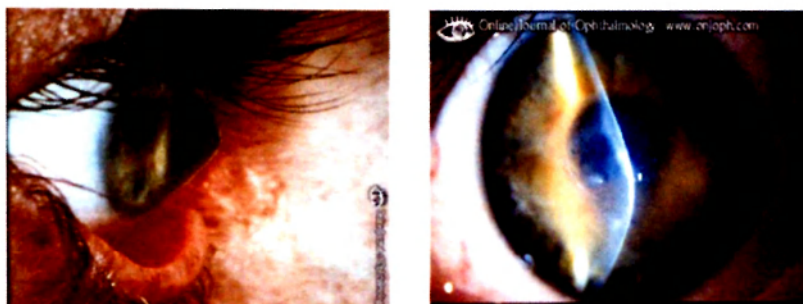
epitelizovaných buněk byly na zadní ploše rohovky vedle normálních endotelových buněk identifikovány i zmenšené a zdegenerované endotelové buňky a buňky jevící se jako fibroblasty (Richardson *et al.*, 1985).

Descemetova membrána má většinou normální přední pruhovanou vrstvu. U pacientů se zadní polymorfni dystrofií ji nacházíme ztenčenou s nehomogenním pruhováním, místy může chybět úplně. Zadní nepruhovaná vrstva bývá více či méně postižena patologickým ukládáním komponent extracelulární matrix, zejména kolagenů; často se jeví jako mnohvrstevná. Tyto vrstvy obsahují shluky malých kolagenních vláken se 100 nm pruhováním, připomínající přední pruhovanou vrstvu. Formování kolagenní vrstvy způsobuje celkové ztluštění DM (Krachmer, 1985).

4.3.3. Keratokonus

Keratokonius je onemocněnė charakterizovanė abnormálním vyklenováním a současným ztenčováním rohovky. Je většinou oboustranné s asymetrickou manifestací. Můžė být vrozený, ale obvykle se manifestuje v období puberty nebo krátce poté; k jeho rozvoji často dochází ve 3. dekádě života. Vyskytuje se častěji u žen než u mužů, a to v poměru 2:1. Můžė se vyskytovat ve spojení s Downovým syndromem, atopií, vernální keratokonjunktivitidou, retinitis pigmentosa nebo Marfanovým syndromem (Kraus, 1997).

Obr. 5 Pacient s keratokonem, vpravo obraz ze štěrbinové lampy.
(zdroj: <http://www.altasophthalmology.com>)



4.3.3.1. Klinické projevy keratokonu

V dnešní době je díky topografickým analyzačním systémům možné diagnostikovat keratokonus dříve, než je patrný nález na štěrbinové lampě. Pacienti si stěžují na horší zrakovou ostrost a na dvojitě či zkreslené vidění. Rozvoj keratokonu vede k myopizaci oka a ke vzniku nepravidelného astigmatizmu. Současně s vyklenováním dochází ke ztenčování rohovky až na polovinu její normální tloušťky, většinou centrálně nebo paracentrálně, lehce temporálně nebo nazálně dole. Bazi keratokonu obkružuje, někdy neúplně, tenký pigmentový Fleischerův prstenec světle hnědé barvy, tvořený depozity železa. V pokročilejších stádiích bývají na vrcholu ztenčení patrné vertikální Vogtovy strie a někdy jizevnaté změny subepiteliálně a ve stromatu. Více jsou patrné rohovkové nervy, které pozorujeme jako síť šedavých linií. Případná ruptura DM vede k akutnímu hydropsu rohovky, to se projeví náhlým

poklesem zrakové ostrosti. V průběhu 2 – 3 měsíců většinou dojde ke spontánnímu zhojení, pacientovi však zůstávají jizvy (Feder *et al.*, 2005, Krachmer *et al.*, 1984).

4.3.3.2. Terapie keratokonu

Pacienti korigují vadu v raných stádiích brýlemi nebo měkkými torickými kontaktními čočkami. Když je tato korekce nedostačující, jsou dalším krokem tvrdé kontaktní čočky. Pokud pacient čočky nesnáší nebo kompenzace nezaručuje dostatečný vizeus, bývá indikována keratoplastika. Tato operace má velmi dobrou prognózu a úspěšnost je více než 95 % (Kraus, 1997). Další možností při nesnášenlivosti čoček je aplikace intrastromálních kroužků, které redukuje vyklenutí rohovky, snižují astigmatismus a tím zlepšují zrakovou ostrost (Gruppenmacher, 2007).

Novou metodou inhibující progresi onemocnění je metoda C3-R (Corneal Collagen Cross-linking with Riboflavin). Na povrch rohovky se většinou po odstranění epitelu aplikují oční kapky s riboflavinem (vitamin B₂), poté dochází k ozáření ultrafialovým zářením (UVA, 365 nm) (Pinelli and Mometto, 2007). Ozáření indukuje vznik nových spojení mezi jednotlivými řetězci kolagenu, přednostně v oblasti stromatu, kam penetroval riboflavin. To je v tloušťce do cca 300 μm (aby záření nepoškodilo vitalitu buněk endotelu). Tím dochází k jeho zpevnění a stabilizaci oslabené struktury rohovky (Wollensak *et al.*, 2004, Seiler *et al.*, 2006).

4.3.3.3. Buněčně–molekulární změny v rohovkách pacientů s keratokonem

Histopatologické změny byly zaznamenány ve všech vrstvách rohovky. V epitelu dochází k významnému centrálnímu ztenčení, v periférii zůstává epitel beze změn. Buňky vrchních vrstev mění svůj tvar, jsou podlouhlé, a mění se i jejich vzájemné uspořádání. V bazální membráně se vyskytují trhliny a některé oblasti mohou být postiženy fibrotickými změnami, to má za následek přímý kontakt epitelu s Bowmanovou vrstvou stromatu.

Elektronová mikroskopie ukázala, že ve stromatu nedochází ke změnám tloušťky kolagenních fibril, početně je jich však výrazně méně. Zmenšuje se také množství proteoglykanů mezi jednotlivými vlákny. Byla prokázána změna orientace vláken. Někteří autoři uvádějí sníženou hladinu kolagenů (zejména typu I) (Sherwin *et al.*, 2004). Dochází i ke změnám v distribuci kolagenu IV, který se na rozdíl od

normálních rohovek vyskytuje v přední části stromatu a Bowmanově vrstvě (Tschuchiya *et al.*, 1986). Dochází ke snížení počtu keratocytů, nejvýznamnější pokles je v oblasti těsně pod Bowmanovou vrstvou. Zbylé buňky jsou proteosynteticky vysoce aktivní, což koresponduje s velkým množstvím endoplazmatického retikula.

Trhliny a záhyby Descemetovy membrány jsou u keratokonu běžným jevem. Jejich původ není zcela jasný (Tschuchiya *et al.*, 1986). Endotel vykazuje většinou normální vzhled, v některých případech je patrná změna tvaru buněk ve smyslu pleomorfismu a elongace (Feder *et al.*, 1994).

5. Materiál a použité metody

5.1. Soubor kontrolních a patologických rohovek

Kontrolní rohovkové terče kontrol byly získány z Oční tkáňové banky VFN a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Tyto tkáně byly vyloučeny z transplantačního programu pro nedostatečné kvalitativní či kvantitativní parametry endotelu nebo pro pozitivní sérologické vyšetření dárce. U dárců rohovek nebylo zjištěno žádné oční onemocnění. Vzorky patologických rohovek byly získány od pacientů s Fuchsovou dystrofií, keratokonem a zadní polymorfní dystrofií při provedení keratoplastiky pro uvedené onemocnění. Výčet kontrolních a patologických rohovek použitých k experimentům se nachází v tabulkách 3 – 6.

Myšší bulby byly z myši z laboratorního chovu kmenu Balbc č. 5.

Vzorky aorty byly lidské.

Tab. 3 Kontrolní rohovky použité při detekci kolagenu VIII (KO1 - KO6: rohovky dárců, věk v době úmrtí, M – muž, Ž – žena)

kontrola	věk	pohlaví
KO1	77	M
KO2	70	M
KO3	77	M
KO4	42	M
KO5	78	Ž
KO6	53	M

Tab. 4 Rohovky pacientů s Fuchsovou dystrofií (FD1 – FD6), věk v době keratoplastiky, OP – oko pravé, OL – oko levé, M – muž, Ž – žena)

Pacient	věk	pohlaví
FD1	68	Ž
FD2 OP	68	Ž
FD 3 OL	68	Ž
FD4	73	Ž
FD5	63	M
FD6	68	Ž

Tab. 5 Rohovky pacientů se zadní polymorfní dystrofií (ZPD1 – ZPD6), věk v době keratoplastiky, OP – oko pravé, OL – oko levé, M – muž, Ž – žena)

Pacient	věk	pohlaví
ZPD1	18	Ž
ZPD2	51	Ž
ZPD3	25	Ž
ZPD4	50	Ž
ZPD5	55	M
ZPD6	48	M

Tab. 6 Rohovky pacientů s keratokonem (KK1 – KK6), věk v době keratoplastiky, OP – oko pravé, OL – oko levé, M – muž, Ž – žena)

Pacient	věk	pohlaví
KK1	17	M
KK2	38	M
KK3	29	M
KK4 OP	29	Ž
KK5 OL	29	Ž
KK6	26	M

5.2. Získání a zpracování vzorků

Kontrolní rohokové terče o průměru 11 – 12 mm byli žiletkou rozděleny na čtvrtiny a použity k přípravě kryořezů a otisků na membrány Millicell. Patologické rohokové terče pacientů o průměru 7,5 – 9 mm bez limbu a spojivky byly použité k přípravě kryořezů.

Čtvrtina každého rohokového terče byla zalitá do zamrazovacího média Optimal Cutting Temperature medium, zamrazená v tekutém dusíku a uchovaná při teplotě

-70°C. Pro pokus byly použity kryořezy o tloušťce 7 μm , v jednom případě 10 μm . Kryořezy byly lepené na podložní skla pokrytá kamencovou želatinou. Do doby použití byly uchovávány při teplotě -20°C. V případě myších vzorků se jednalo o řezy celým bulbem.

Pro přípravu membrán Millicell (Biopore MILLICELL®-CM, PICM 01250, Millipore) byla použita polovina každého rohokového terče, z každého byly zhotoveny 4 otisky epitelu nebo endotelu rohovky. Membrány byly zamrazené a do doby zpracování uchované při -70°C.

5.3. Nepřímá imunohistochemie

Pro zjištění výskytu kolagenu typu VIII v kontrolních a patologických tkáních byla použita metoda nepřímé imunohistochemie (IHC). Tato metoda slouží k detekci antigenů s využitím imunologické vazby, tedy vazby vznikající na principu vazby antigenu a protilátky. Při přímé IHC je primární látka označena přímo (například fluorescenčně). Při nepřímé IHC se na tkáňové řezy nejdříve aplikuje neoznačená protilátka (primární), která je specifická proti prokazovanému antigenu. Pak se nanáší sekundární protilátka, která je značená fluorochromem nebo enzymem a váže se na primární protilátku.

V našich experimentech byla použita nepřímá trojstupňová metoda za použití streptavidin-biotin-komplexu, která slouží k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu v tkáni je nízké. Využívá schopnost pevné neimunologické a druhově nespecifické vazby vaječného glykoproteinu bílku avidinu (získaného z bakterie *Streptomyces avidini*) s biotinem. Princip spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě se streptavidin-biotinovým komplexem (SABC)

označeným křenovou peroxidázou (horse-radish peroxidase, HRP). Enzymatická aktivita této peroxidázy pak indikuje zbarvením preparátu ta místa, v nichž došlo k primární specifické reakci (Beranová *et al.*, 2002).

5.4. Protilátky proti kolagenu VIII

V současné době je proti kolagenu typu VIII komerčně dostupná pouze jediná protilátka (rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen, od firmy COSMO BIO CO., LTD., Japonsko). Tato polyklonální protilátka primárně reaguje s kolagenem VIII v myší tkáni. Deklarovaná je křížová reaktivita s lidskou tkání. Tato protilátka byla použita nejdříve.

Dále jsme použili monoklonální myšší protilátku proti kolagenu VIII (9H3 anti α 1CVIII), dar Dr. Greenhilla a Dr. Davise (Greenhill *et al.*, 2000).

[Poznámka: Dříve dostupná protilátka proti kolagenu VIII (Saikagaku, Japonsko), jejíž reaktivita v lidské tkáni byla opakovaně prokázána, se již nevyrábí.]

5.5. Zjištění pracovní koncentrace protilátky pro detekci kolagenu VIII v lidské rohovce

Pro zjištění pracovní koncentrace a funkčnosti protilátky se nejdříve protilátka ředí v tzv. koncentrační řadě a testuje se na vzorcích s předpokládanou přítomností hledaného antigenu. Určí se tak, která koncentrace je pro detekci antigenu nejvhodnější.

Pro protilátku rabbit anti mouse MAP type VIII Collagen jsme použili koncentrační řadu: 1:50, 1:100, 1:150, 1:200. Pro tuto koncentrační řadu jsme použili protokol pro nepřímou enzymovou imunohistochemii s použitím peroxidázy (kapitola 5.6.1.).

Pro protilátku 9H3 anti α 1CVIII jsme použili koncentrační řadu: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Pro tuto koncentrační řadu jsme použili protokol pro nepřímou enzymovou imunohistochemii s použitím alkalické fosfatázy (kapitola 5.7.).

5.6. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen

5.6.1. Protokol – nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím UltraTech HRP (AEC) streptavidin-biotin peroxidázy (KIT)

Kryořezy na podložních sklech nechat při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Fixace: 10 min. aceton

Mřížka: oddělení jednotlivých řezů na podložním skle pomocí PAP PEN pera, aby nedošlo ke smíchání protilátky s negativní kontrolou (na skle 4 řezy, jeden vždy použit jako negativní kontrola).

Oplach: PBS 3x 5 min.

Blok endogenní peroxidázy: 3% peroxid vodíku 5 min.

Oplach: PBS 3x 5 min.

Blok: Protein Blocking Antigen (PBA) 5 min.

Primární protilátka: rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen v 1% BSA v PBS, koncentrace 1:150, inkubace 1 hod. při pokojové teplotě

Oplach: PBS 3x 5 min.

Sekundární protilátka: biotin, inkubace 30 min. při pokojové teplotě

Oplach: PBS 3x 5 min.

Terciální protilátka: streptavidin/HRP, inkubace 30 min. při pokojové teplotě

Oplach: PBS 3x 5 min.

Substrát/chromogen AEC: 26,4 µl chromogenu do 2000 µl substrátu, 1 min. (substrátem je peroxid vodíku, chromogenem AEC 3-amino-9-ethylkarbazol)

Oplach: destilovaná voda

Dobarvení: Harissův hematoxylin, 15 sec.

Oplach: destilovaná voda

Oplach: pod tekoucí vodou

Uschnoutí ve vertikální poloze

Montování: vodní médium Aquatex

5.6.2. Protokol – nepřímá enzymová imunohistochemie s denaturací citrátem

Kryořezy na podložních sklech nechat při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Fixace: 10 min. aceton

Oplach: PBS 5 min

Denaturace: citrátový pufr do mikrovlnné trouby na 800 W, 1 min.

Oplach: PBS 5 min.

Blok endogenní peroxidázy: 3% peroxid vodíku 5 min.

Dále je postup stejný jako u protokolu 5.6.1.

5.6.3. Protokol – nepřímá enzymová imunohistochemie s denaturací ureou

Kryořezy na podložních sklech nechat při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Fixace: 10 min. aceton

Mřížka: tukovým perem PAP PEN

Oplach: HCl/KCl pufr 10 min.

Oplach: PBS 3x 5 min.

Blok endogenní peroxidázy: 3% peroxid vodíku 5 min.

Oplach: PBS 3x 5 min.

Denaturace: v chlazená glycin/urea

Dále je postup stejný jako u protokolu 5.6.1.

5.6.4. Protokol – nepřímá enzymová imunohistochemie na membránách Millicell

Vzorky jsou otisky epitelu a endotelu lidské rohovky. Experimenty byly provedeny podle protokolu 5.6. s tou obměnou, že membrány Millicell byly přeneseny na nosná krycí sklíčka. Inkubace probíhaly mezi nosným krycím sklíčkem a podložním materiálem Parafilm. K permeabilizaci buněk byl použit 0,2% roztoku Tritonu po dobu 10 minut. Tento krok následoval po prvním oplachu v PBS, dále se pokračovalo dle protokolu 5.6.1.

5.7. Použití protilátky 9H3 anti α 1CVIII

Protokol – nepřímá enzymová imunohistochemie s použitím StreptAB/AP komplexu

Kryořezy na podložních sklech nechat při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Fixace: 10 min. aceton

Mřížka: tukovým perem PAP PEN

Oplach: TBS 3x 5 min.

Primární protilátka: 9H3 anti α 1CVIII v TBS, koncentrace 1:20, inkubace 1 hod. při pokojové teplotě

Oplach: TBS 3x 5 min.

Sekundární protilátka: biotinizovaný (Rb anti Ms), inkubace 30 min. při pokojové teplotě (protilátku připravit alespoň 30 min. před inkubací a dát do lednice)

Oplach: TBS 3x 5 min.

Terciální protilátka: streptAB complex/AP v TBS (1 μ i A i B na 1 ml TBS), inkubace 30 min. při pokojové teplotě

Oplach: TBS 3x 5 min.

Substrát: Naphtol 6,25 g, Levamizol 3,0 g, Fast Red 6,25 g, Veronal acetátový pufr 12,5 ml, před použitím přefiltrovat, 10 min.

Oplach: destilovaná voda

Dobarvení: Harissův hematoxylin, 15 sec.

Oplach: destilovaná voda

Oplach: pod tekoucí vodou

Uschnoutí ve vertikální poloze

Montování: vodní médium Aquatex

5.8. Hodnocení

Vzorky byly pozorované ve světelném mikroskopu (Olympus BX 51) při zvětšení 200x – 400x. Dále byla pořízena obrazová dokumentace pomocí kamery Vosskühler VDS CCD – 130OCB (VDS Vosskühler GmbH, Německo). Analýza byla provedena v programu NIS Elements (LIM, Laboratory Imaging, ČR). Každý experiment byl provedený v duplikátu. Hodnoceny byly následující parametry:

1. Míra positivity podle následující stupnice:

- negativita

+ slabá intenzita

++ střední intenzita

+++ silná intenzita

++++ velmi silná intenzita

2. Lokalizace signálu byla hodnocená v jednotlivých vrstvách rohovky.

5.9. RT - PCR

Reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce (RT - PCR) je metoda založená na detekci mRNA (mediátorové RNA) ve sledovaných buňkách. Její specifita je založena na použití primerů, výchozích nukleotidových jednotek, které hybridují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. První reakcí je reverzní transkripce izolované mRNA, při které vzniká cDNA (jednovláknová molekula DNA komplementární k mRNA). Určitý úsek této cDNA se následně za použití TAQ polymerázy amplifikuje v polymerázové řetězové reakci.

Použité primery:

COL8A2HuR: 5' - TCC TGA AAA GGA GGA GTG GA - 3'

COL8A2HuF: 5' - GCG GCG TCT ACT ACT TTG CT - 3'

COL8A1HuR: 5' - TTG TTC CCC TCG TAA ACT GG - 3'

COL8A1HuF: 5' - CCT GGG TCA GCA AGT ACC TC - 3'

5.9.1. Protokol – PCR

Izolace RNA

Vzorky: lidská aorta (vzorek 1 a 2)

Homogenizace: do zkumavky se vloží vzorek a 800 µl TRI reagentu a umístí se do -70°C na 15 min., aby se mrazem ulehčila homogenizace buněk. Pak se nechá rozmraznout při pokojové teplotě a vzorky se třením homogenizační tyčinkou mechanicky rozdrtí.

Separace fází: homogenát se smíchá se 200 µl chloroformu a obsah se promíchá rychlým otáčením zkumavek po dobu 15 sec. Směs se inkubuje 2 – 10 min. při 4°C a

poté se centrifuguje 15 min. při 12000g při 4°C. Směs se rozdělí do spodní růžové fenol-chloroformové fáze, interfáze a horní bezbarvé vodné fáze, která obsahuje RNA.

Precipitace RNA: do nových zkumavek se vloží 4 µl glykogenu, ke glykogenu se přeneše horní vodná fáze a lehce promíchá. Přidá se 300 µl isopropanolu a řádně promíchá. Poté se vzorky inkubují 10 minut při pokojové teplotě a pak se centrifugují 8 minut při 12000g (a 4°C).

Promytí RNA: odstraní se supernatant (vylít a osušit hrdlo mikrozkušavky), k precipitátu se přidá 800µl 75% ethanolu a centrifuguje se 5 minut při 7500g při 4°C .

Solubilizace RNA: ethanol se odstraní a vzorky se lehce osuší v tepelném bloku při teplotě 55°C (ethanol překáží při elektroforéze, ale nesmí dojít k úplnému vysušení RNA, protože by se výrazně snížila její rozpustnost). RNA se rozpustí ve 20 µl ultračisté vody (neobsahující RNasy) a inkubuje se 15 minut při teplotě 55°C. Pokud se s RNA ihned nepracuje, uchovává se při teplotě -70°C.

Kontrola provedení izolace:

1. Spektrofotometrie

Do kyvety se napipetuje 100 µl ultračisté vody a nastaví se nulová hodnota pro referenční měření blanku. Do kyvety se nalije předem smíchaný roztok 98 µl deionizované vody a 2 µl roztoku izolované RNA. Vzorky se změří spektrofotometrem (Helios Gamma, Thermo Spectronic, UK) při 260 a 280 nm. Poměr A260/A280 nad 1,8 určuje dobrou čistotu RNA.

Naměřené výsledky se přepočítají na koncentrace dle údajů na:

www.molbiol.ru/eng/scripts/01_03.html

2. Gelová elektroforéza (80 V)

Připraví se 1% agarózový gel v Tris-Borat-EDTA pufru (TBE) s přidavkem fluorescenčního interkalačního barviva ethidium bromidu. Do jamek v ztuhlém gelu nanášíme:

- Ladder: 5µl
- Vzorky izolované RNA: 5 µl roztoku RNA + 7 µl roztoku bromfenolové modři s přidavkem glycerolu

Při gelové elektroforéze v agarózovém gelu putují jednotlivé fragmenty RNA v elektrickém poli ve směru od záporné elektrody ke kladné. Větší fragmenty se v gelu pohybují pomaleji, tím dochází k rozdělení těchto fragmentů podle hmotnosti. Poté gel

uložíme pod UV-transiluminátor a díky fluorescenci ethidium bromidu pozorujeme rozdělení RNA v gelu.

Isolací byly z každého vzorku získány 2 vzorky (1a, 1b, 2a, 2b)

Reverzní transkripce

Vzorky: A 1a C 1b
 B 2a D 2b

Postup:

1. Smícháme hexanukleotidy, dNTP (nukleotidtrifosfát), RNA a vodu pro PCR. Směs se umístí do cyklu na 5 minut při teplotě 65°C.
2. Zkumavky se ochladí, přidá se pufr, ditriitol a inhibitor RNáz. Směs se umístí do cyklu na 2 minuty při teplotě 25°C.
3. Přidá se 0,5 µl reverzní transkriptázy a zkumavky se vrátí do cyklu, kde se inkubují 10 minut při teplotě 25°C.
4. 99 minut při teplotě 42°C běží reverzní transkripce. Nakonec se reakce ukončí inaktivací při teplotě 70°C po dobu 15 minut.

Výsledkem je přepis RNA vyizolované z endotelu aorty na cDNA potřebnou pro PCR. Tento postup nemá vlastní vyhodnocení, ověření úspěšnosti se děje pomocí následujících experimentů.

PCR – β -actin

Vzorky: cDNA kolagenu VIII A 1a C 1b
 B 2a D 2b

Postup:

počáteční denaturace: 2 minuty při teplotě 95°C
32 cyklů: denaturace: 25 sekund při teplotě 95°C
 hybridizace primerů: 30 sekund při teplotě 56°C
 prodlužování řetězce: 45 sekund při teplotě 72°C
dosyntetizování: 10 minut při teplotě 70°C
schlazení: při teplotě 4°C

Jednotlivé vzorky:

1x negativní kontrola (směs bez cDNA)
1...amplifikace β -actinu, vzorek A

2...amplifikace β -actinu, vzorek B

3...amplifikace β -actinu, vzorek C

4...amplifikace β -actinu, vzorek D

Výsledek: Výsledná amplifikace byla kontrolována 2% agarózovou elektroforézou.

PCR – kolagen VIII

Vzorky: α 2 řetězec kolagenu VIII: cDNA ze vzorku 2a, 2b

Postup:

počáteční denaturace: 2 minuty při teplotě 95°C

38 cyklů: denaturace: 25 sekund při teplotě 95°C

hybridizace primerů: 30 sekund při teplotě 65°C

prodlužování řetězce: 45 sekund při teplotě 72°C

dosyntetizování: 10 minut při teplotě 70°C

schlazení: při teplotě 4°C

Jednotlivé reakce:

1x negativní kontrola (směs bez cDNA)

1x amplifikace Kol 8

Výsledek: Výsledná amplifikace byla kontrolována 2% agarózovou elektroforézou.

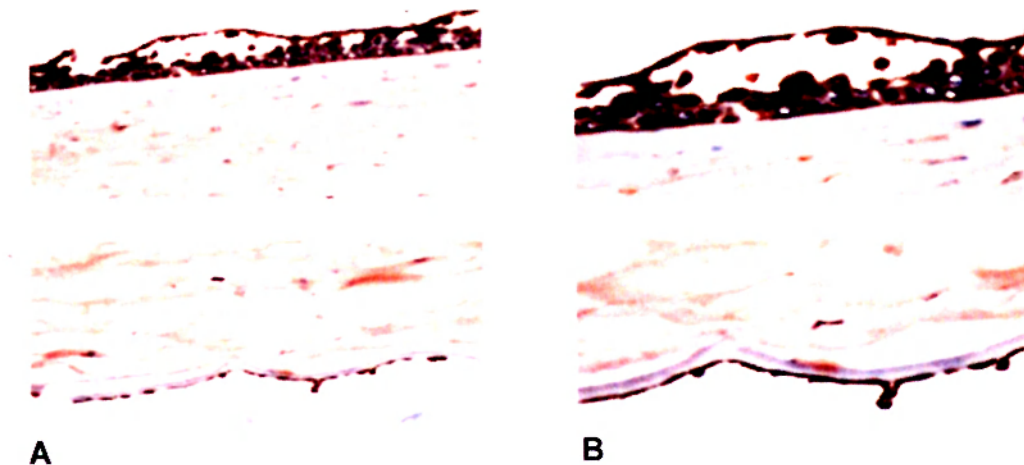
6. Výsledky

6.1. Koncentrační řada

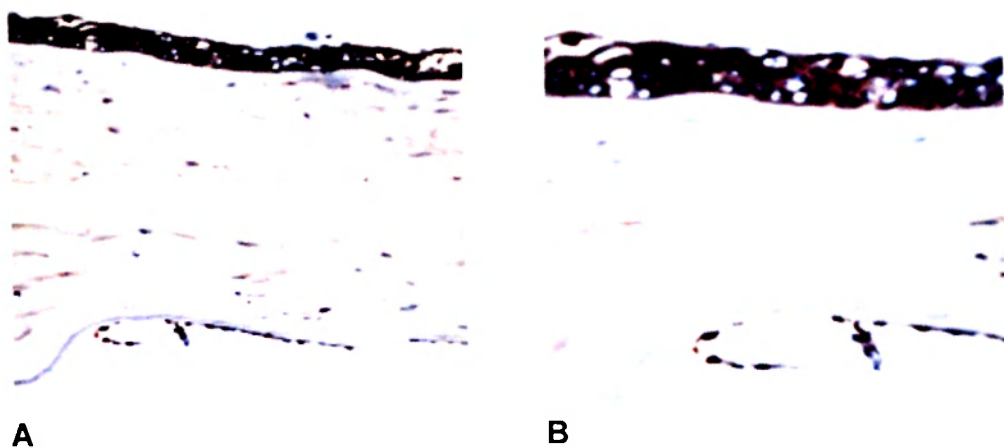
Koncentrační řadou jsme hledali vhodné ředění primární protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen proti kolagenu VIII. Doporučené ředění od výrobce bylo 1:50 – 1:200. Na myšším bulbu byly zkoušeny koncentrace 1:20 a 1:200, na kontrolních lidských rohovkách 1:50, 1:100, 1:150 a 1:200 (Obr. 6 – 9). Jako nejvhodnější byly vybrány koncentrace 1:100 a 1:150, mezi nimiž nebyl ve výsledku téměř žádný viditelný rozdíl. Pro experimenty s myšimi i lidskými rohovkami byla tedy zvolena koncentrace 1:150.

U protilátky 9H3 anti α 1CVIII byla doporučená koncentrace 1:10. Na kontrolních rohovkách jsme zkoušeli koncentrace koncentrační řadu: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Následně jsme pro experimenty zvolili koncentraci 1:20.

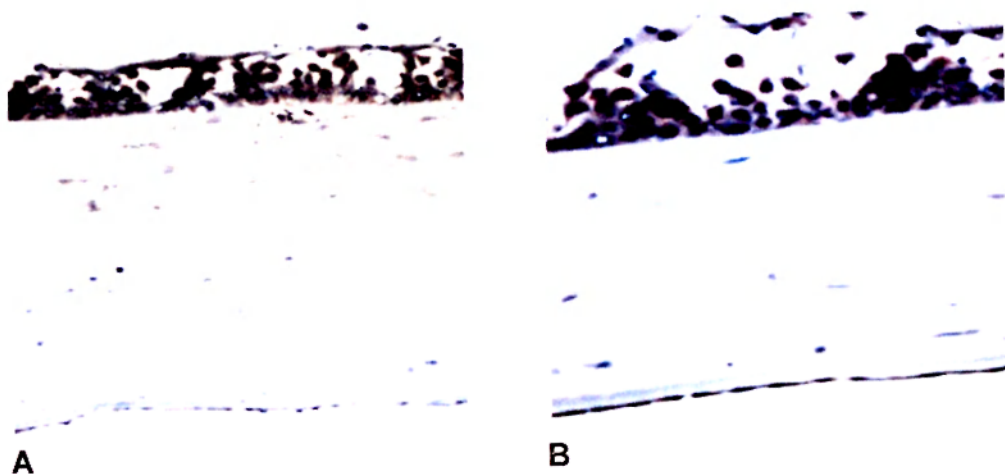
Obr. 6 Koncentrace primární protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen 1:50, A – zvětšeno 200x, B – zvětšeno 400x.



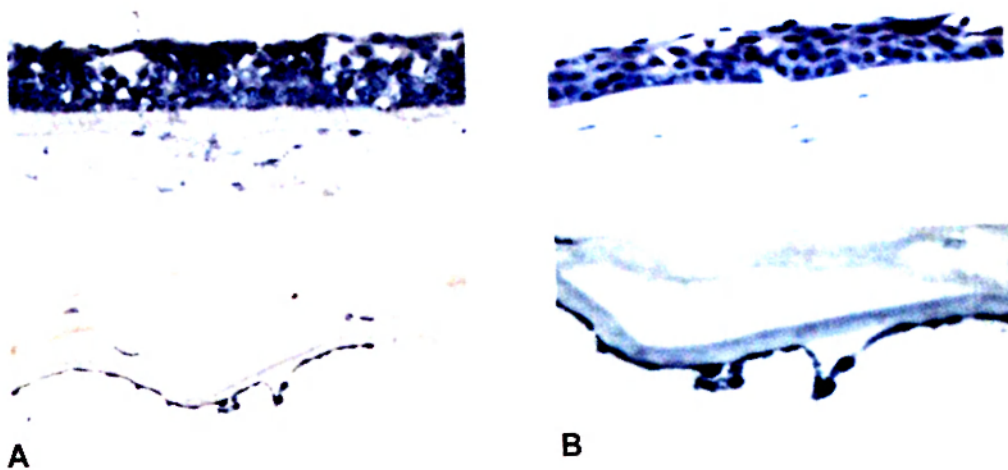
Obr. 7 Koncentrace primární protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen 1:100, A – zvětšeno 200x, B – zvětšeno 400x.



Obr. 8 Koncentrace primární protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen 1:150, A – zvětšeno 200x, B – zvětšeno 400x.



Obr. 9 Koncentrace primární protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen 1:200, A – zvětšeno 200x, B – zvětšeno 400.



6.2. Nepřímá enzymatická imunohistochemie s použitím protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen

Výsledky detekce kolagenu VIII metodou nepřímé imunohistochemie jsou shrnuté v tabulkách v následujících kapitolách.

6.2.1. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen na kontrolních rohovkách

Tab. 7 Lokalizace kolagenu VIII v kontrolních rohovkách

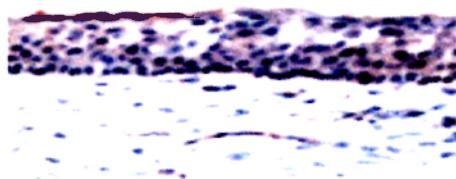
	ENDOTEL	EPITEL	BME	DM	STROMA
KO1	+++	+	-	+	-
KO2	++	+	-	+	-
KO3	+++	++	-	-	-
KO4	+	+	-	-	-
KO5	++	++	-	-	-
KO6	++	++	-	-	+

U všech zkoumaných kontrolních vzorků byla pozorovaná pozitivita v epitelu. Ve třech případech vykazovala povrchová vrstva epitelu o stupeň vyšší pozitivitu než vrstvy bazální a suprabazální. Bazální membrána epitelu byla ve všech případech podle předpokladů negativní. Stroma vykazovalo pozitivitu jen v jednom případě. Pozitivita Descemetovy membrány se ve dvou případech projevovala jako souvislý pruh v její střední části, u jednoho vzorku se pruh objevil místy i ve stromální části membrány. V pěti případech byla DM negativní. Endotel všech vzorků byl v různé míře pozitivní (Obr. 10).

Obr. 10 Lokalizace kolagenu VIII v kontrolních rohovkách, zvětšeno 200x, vlevo negativní kontrola



A



B

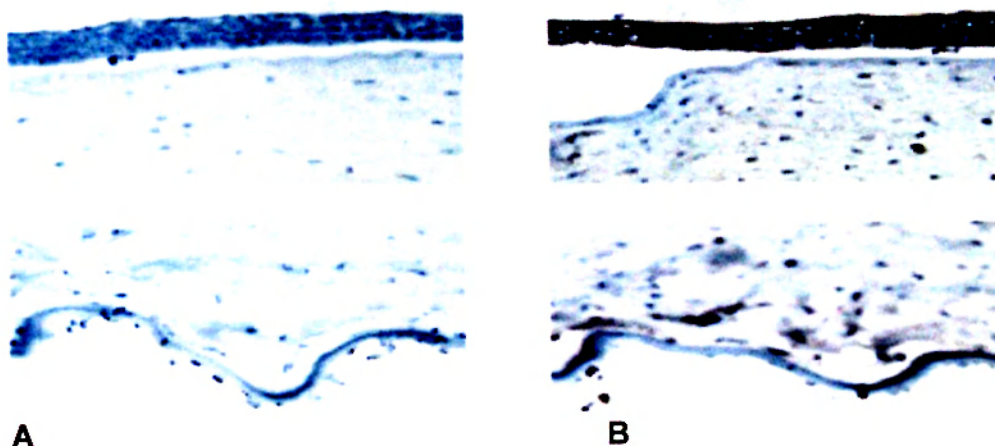
6.2.2. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen na rohovkách pacientů s Fuchsovou dystrofií

Tab. 8 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů s Fuchsovou dystrofií

	ENDOTEL	EPITEL	BME	DM	STROMA
FD1	++	++	-	-	-
FD2	-	-	-	-	-
FD3	++	+++	-	-	-
FD4	++	++	-	+	-
FD5	-	++	-	-	-
FD6	+	++	-	+	-

U pacientů s Fuchsovou dystrofií vykazoval epitel souvislé zbarvení bez rozdílů pozitivita v jednotlivých vrstvách. BME i stroma byly ve všech případech negativní. Pozitivita DM se v jednom případě projevila jako linie na stromální straně, v druhém případě jako středová linie. U endotelu se projevila střední pozitivita u čtyř ze šesti pacientů (Obr. 11).

Obr. 11 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů s Fuchsovou dystrofií, zvětšeno 200x, vlevo negativní kontrola



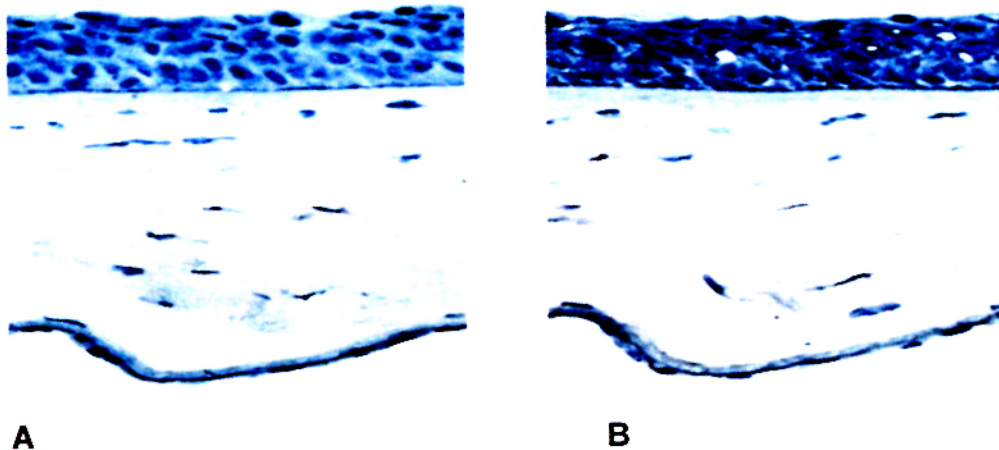
6.2.3. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen u pacientů se zadní polymorfní dystrofií

Tab. 9 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů se zadní polymorfní dystrofií rohovky

	ENDOTEL	EPITEL	BME	DM	STROMA
ZPD1	+	-	-	-	-
ZPD2	-	-	-	-	-
ZPD3	++	+	-	-	-
ZPD4	-	-	-	-	-
ZPD5	-	-	-	-	-
ZPD6	+	+	-	-	-

U pacientů se zadní polymorfní dystrofií rohovky byl epitel slabě pozitivní ve dvou případech. BME i stroma byly negativní u všech pacientů. DM byla negativní. Endotel byl středně pozitivní u jednoho pacienta, slabou pozitivitu vykazovaly dva vzorky (Obr. 12).

Obr. 12 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů se zadní polymorfní dystrofií, zvětšeno 200x, vlevo negativní kontrola.



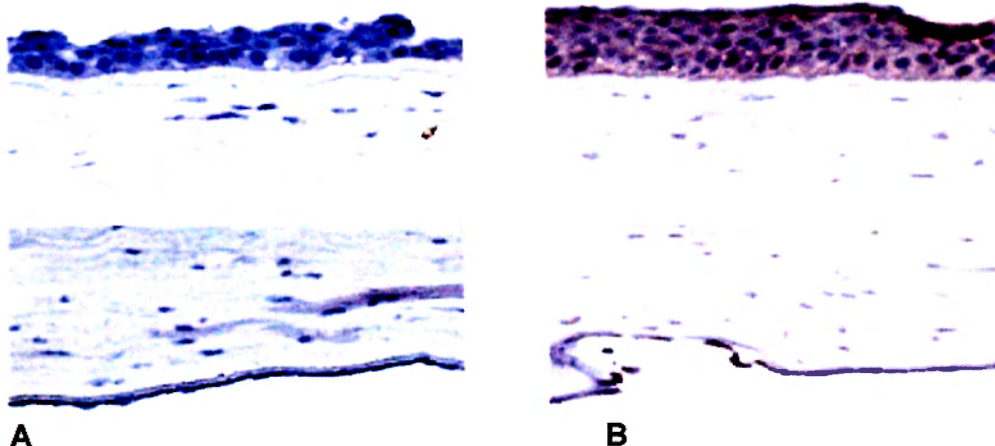
6.2.4. Použití protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen u pacientů s keratokonem

Tab. 10 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů s keratokonem

	ENDOTEL	EPITEL	BME	DM	STROMA
KK1	++	-	-	-	-
KK2	++	-	-	-	-
KK3	++	+	-	-	-
KK4	+	++	-	+	-
KK5	+	+	-	-	-
KK6	+	+	-	-	-

U pacientů s keratokonem byl epitel ve dvou případech negativní, ve dvou případech se projevila vyšší pozitivita v povrchových buňkách epitelu. BME i stroma byly negativní u všech pacientů. DM vykazovala pozitivitu ve formě přerušované linie v bazální vrstvě u jednoho pacienta. Endotel všech pacientů byl slabě až středně pozitivní (Obr. 13).

Obr. 13 Lokalizace kolagenu VIII u pacientů s keratokonem, zvětšeno 200x, vlevo negativní kontrola



Výsledky experimentů s denaturací citrátem a ureou na kontrolních rohovkách se významně nelišily od výsledků získaných ze vzorků, u kterých nebyla denaturace provedena.

6.3. Nepřímá enzymová imunohistochemie na membránách Millicell s použitím protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen

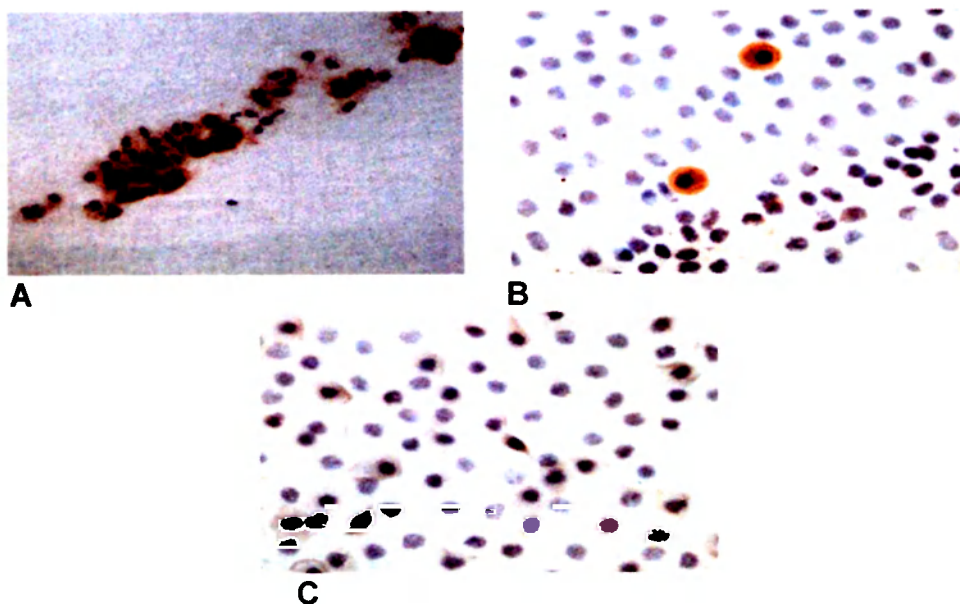
Na membránách Millicell s otisky epitelu nebo endotelu (dva otisky epitelu, dva otisky endotelu) se hodnotila pozitivita podle stejné stupnice jako u imunohistochemické metody na kryořezech (kapitola 5.8.). V oblasti 500 buněk se zjišťovalo procento pozitivních buněk.

Oba vzorky vykazovaly pozitivitu endotelových buněk pro kolagen VIII. Výsledky jednotlivých vzorků se lišily. U prvního vzorku se vyskytovaly buňky jak negativní, tak i s nízkou až silnou pozitivitou (Obr. 15 A). Celkově byl vzorek pozitivní z 80 %. U druhého vzorku bylo středně pozitivních jen 10 % buněk, ostatní byly negativní (Obr. 15 B).

U prvního vzorku epitelu bylo středně pozitivních buněk 50 %, ostatní byly negativní. U druhého vzorku vykazovalo slabou pozitivitu 70 % buněk, střední pozitivita se vyskytovala u 10 % (Obr. 15 C).

Obr. 15 Otisková cytologie rohovky na membráně Millicell, detekce kolagenu VIII.

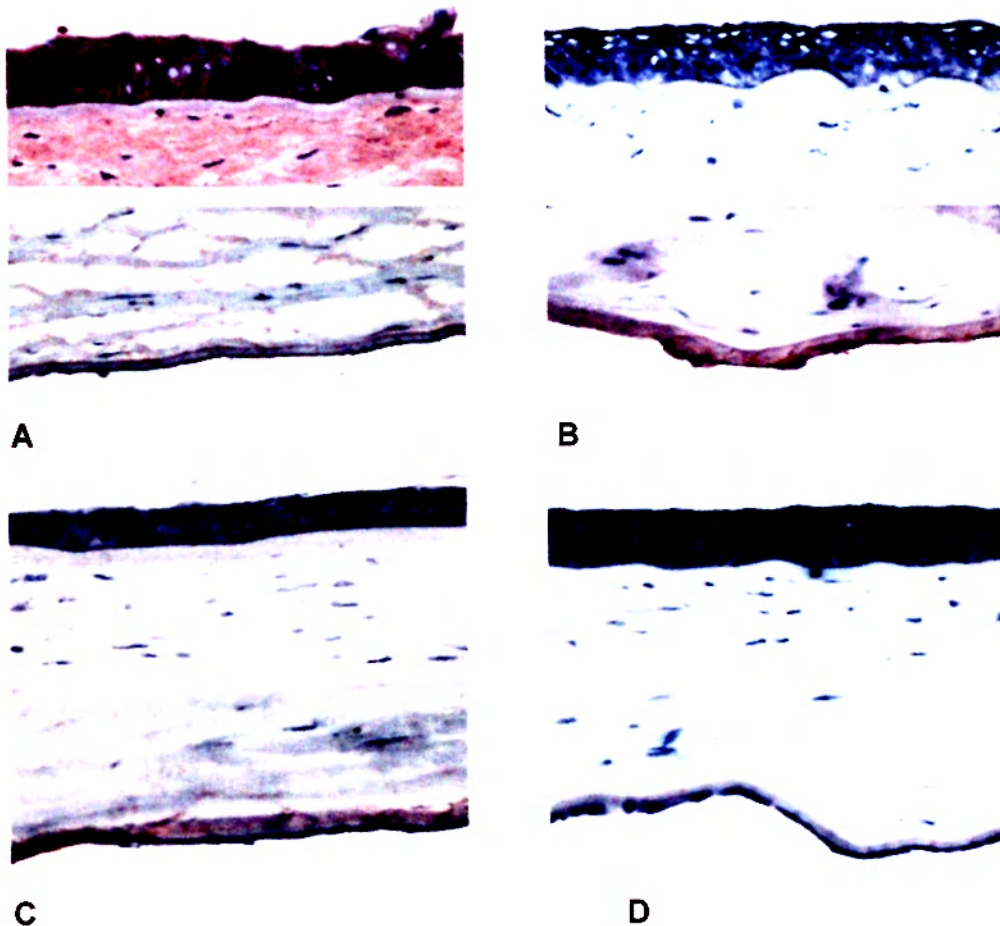
A – otisk endotelu, zvětšeno 200x, B - otisk endotelu, zvětšeno 400x, C – otisk epitelu, zvětšeno 400x



6.4. Nepřímá enzymatická imunohistochemie s protilátkou 9H3 anti α 1CVIII

S použitím této monoklonální protilátky byl epitel u kontrolních i patologických rohovek negativní. Také stroma bylo negativní u 100 % vzorků. Descemetova membrána byla u všech zkoumaných vzorků pozitivní (Obr. 14). U kontrol byla pozitivita DM v podobě linie na její stromální straně. U rohovek s Fuchsovou dystrofií byla DM středně pozitivní v celé tloušťce i délce a vykazovala charakteristickou "síťovou pozitivitu" (Obr. 14 B). U rohovek se zadní polymorfní dystrofií byla DM slabě pozitivní z 80 %, z toho v 10 % jen ve stromální části membrány. U rohovek s keratokonem vykazovala DM střední pozitivitu ve 20 % v celé tloušťce. Endotel byl spíše negativní, jasnou pozitivitu vykazoval pouze v případě FD.

Obr. 14 Lokalizace kolagenu VIII u kontrolních rohovek, zvětšeno 200x, A – kontrola, B - Fuchsova dystrofie, C – zadní polymorfní dystrofie, D – keratokonus.



6. 5. Polymerázová řetězová reakce

Touto metodou jsme zjišťovali expresi genu pro kolagen VIII na základě přítomnosti transkribované mRNA.

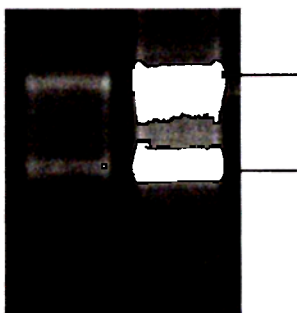
Izolace RNA

Izolací každého ze dvou vzorků jsme dostali dva vzorky pro další krok, kterým byla reverzní transkripce. Kvalita izolace se ověřuje elektroforeticky (Obr. 16) a spektrofotometricky.

Naměřené výsledky: 1... koncentrace 362,3 ng/μl

2... koncentrace 1,24 μg/μl

Obr. 16 Kontrola integrity izolace RNA, pruhy (bandy) reprezentují rRNA (horní 28s rRNA, dolní 18s rRNA).



Reverzní transkripce

Výsledkem je přepis RNA vyizolované z endotelu aorty na cDNA potřebnou pro kvalitativní PCR. Tento postup nemá vlastní vyhodnocení, ověření úspěšnosti se děje pomocí následujících experimentů.

PCR – β -actin

Amplifikovanou DNA pro β -actin detekujeme pomocí 2% agarózové elektroforézy (Obr. 17).

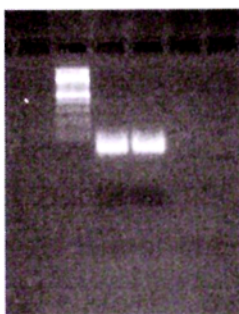
Obr. 17 PCR na β -actinu, horní band u vzorků představuje β -actin.



PCR – kolagen VIII

Výsledná amplifikace byla kontrolována 2% agarózovou elektroforézou. Vše bylo negativní (Obr. 18).

Obr. 18 PCR pro kolagen VIII – neúspěšná amplifikace kolagenu VIII ve vzorcích (chybí horní band).



7. Diskuze

Kolagen typu VIII se v rohovce vyskytuje v Descemetově membráně, v endotelových buňkách, které extracelulární matrix DM produkují (Gottsch *et al.*, 2005a, Greenhill *et al.*, 2000), a ve stromatu (Sawada *et al.*, 1990, Hopfer *et al.*, 2005)). V ostatních vrstvách rohovky se nevyskytuje. Cílem této práce bylo detekovat pomocí imunohistochemické metody kolagen VIII v normální lidské rohovce a následně zjistit případné změny v rohovkách patologických (Fuchsova dystrofie, zadní polymorfní dystrofie, keratokonus).

Prvním krokem v našich experimentech bylo zvolení vhodné pracovní koncentrace protilátky rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen firmy COSMO BIO, Ltd. K tomu jsme použili koncentrační řadu v rozmezí 1:20 až 1:200. Na základě experimentů jsme jako nejvhodnější určili koncentraci 1:150.

Experimenty jsme prováděli metodou nepřímé enzymové imunohistochemie nejdříve na kontrolních rohovkách dárců. U výsledků nás překvapila již deklarovaná pozitivita epitelu, naopak pozitivitu v DM vykazovala jen třetina zkoumaných vzorků. I u nich se lokalizace lišila, většinou byla ve formě souvislého pruhu ve středové části membrány, v jednom případě byl přítomen souvislý pruh i na stromální straně. Stroma vykazovalo pozitivitu v jednom případě.

Vzhledem k jednoznačně potvrzenému výskytu v DM (Kapoor *et al.*, 1988, Greenhill *et al.*, 2000) jsme se úpravami imunohistochemické metody snažili zvýšit pozitivitu v této oblasti. Proto dalším krokem byly pokusy s denaturací vzorků citrátem a ureou, které by měly odhalit antigenní epitopy kolagenu VIII. Tyto pokusy však žádné změny ve výsledcích nepřinesly a výskyt positivity se nelišil od výskytu při pokusech bez denaturace. Zvýšená přítomnost kolagenu VIII v DM nebyla zaznamenána ani pomocí fluorescenční imunohistochemické metody (data nejsou předložena).

Pro potvrzení positivity endotelových a epitelových buněk na kolagen VIII jsme další experimenty provedli na membránách Millicell s otisky epitelu a endotelu. Pozitivitu v rozmezí 10 – 80 % a v intenzitě od slabé po silnou vykazovaly oba vzorky endotelu. U epitelu bylo slabě až středně pozitivních 50 – 80 % buněk.

I když jsme se domnívali, že protilátka není proti kolagenu VIII zcela specifická, přistoupili jsme k experimentům na patologických rohovkách. Výsledky se významně

nelišily od kontrolních rohovek. BME i stroma byly negativní ve všech případech. Na rozdíl od kontrol, kde byl epitel pozitivní ve 100 %, vykazoval epitel u FD pozitivitu v 83 %, u ZPD v 33 % a u KK v 66,5 % vzorků. Výskyt positivity v DM zde byl celkově nižší než u kontrol. U FD vykazovaly pozitivitu dva vzorky (33 %), u KK jeden (16,5 %) a u ZPD byly všechny negativní. V případě endotelu byly negativní dva vzorky u FD (66,5 %), u ZPD také dva vzorky (66,5 %), u keratokonu byl endotel pozitivní u všech zkoumaných vzorků.

Důvodem, proč se naše výsledky rozcházejí s předpoklady byla nejspíše nízká specifita této polyklonální protilátky proti kolagenu VIII a křížová reaktivita se zatím neidentifikovaným proteinem přítomným zejména v epitelu rohovky. V našich experimentech jsme pracovali s jedinou komerčně dostupnou protilátkou proti kolagenu VIII na trhu od Japonské firmy COSMO BIO Ltd. Protilátky, které byly ověřené, a se kterými pracoval například Ljubimov (Ljubimov *et al.*, 1995) už v současné době na trhu nejsou.

Metodou RT - PCR jsme chtěli zjistit přítomnost mRNA pro kolagen VIII v buňkách endotelu. Pokud by se jeho přítomnost potvrdila, vyzkoušeli bychom na tomto vzorku naši protilátku proti kolagenu VIII pro nepřímou imunohistochemii a tím potvrdili nebo vyvrátili její citlivost a účinnost. Pro tento experiment jsme si vybrali vzorky lidské aorty, u kterých byl výskyt kolagenu VIII mnohonásobně potvrzen (Sage *et al.*, 1983, Ruger *et al.*, 1996). Při kontrole výsledné amplifikace však bylo vše negativní. Chyba mohla být pravděpodobně v použitých primerech, podle kterých se vybírá hledaná sekvence nukleové kyseliny pro následnou amplifikaci. V současné době byly objednány nové primery a tato metoda bude na kolagenu VIII dále zkoušena.

V době dokončování této práce jsme obdrželi monoklonální protilátku 9H3 anti $\alpha 1$ CVIII připravenou Dr. Greenhillem a Dr. Davisem z Nového Zélandu (Greenhill *et al.*, 2000). První výsledky práce s touto monoklonální protilátkou jednoznačně ukazují její výraznou specifickou pozitivitu v oblasti DM u kontrolních rohovek. Dále se ukázalo, že pomocí této protilátky je možné prokázat změny ve výskytu a distribuci kolagenu VIII v patologických rohovkách: charakteristické "síťování" kolagenu VIII v DM pacientů s Fuchsovou dystrofií a výrazný pokles positivity v DM rohovek se zadní polymorfní dystrofií.

8. Závěr

Tato práce přináší literární přehled o výskytu kolagenu typu VIII v rohovce. Praktická část je zaměřena na lokalizaci tohoto kolagenu v jednotlivých vrstvách rohovky u kontrolních a patologických rohovek s Fuchsovou dystrofií, zadní polymorfní dystrofií rohovky a s keratokonem.

Pro nespecifitu protilátky proti kolagenu VIII (rabbit IgG anti mouse MAP type VIII Collagen) se naše výsledky neshodují s předpoklady o jeho lokalizaci. Pomocí monoklonální protilátky 9H3 anti $\alpha 1$ CVIII byla jednoznačně prokázána přítomnost řetězce $\alpha 1$ kolagenu VIII v DM. Dále bylo prokázáno, že pomocí této protilátky je možné detekovat změny v distribuci kolagenu VIII v patologických rohovkách získaných od pacientů s Fuchsovou dystrofií a zadní polymorfní dystrofií.

Vzhledem k tomu, že funkce kolagenu VIII není dodnes zcela jasná, a jeho změny v expresi a lokalizaci mohou hrát důležitou roli v patogenezi rohovky, je toto téma stále otevřené a vybízející k dalšímu studiu.

9. Seznam použité literatury

1. **Adamis, A.P.**, Filatov, V., Tripathi, B.J., Tripathi, R.C. (1993): Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea, *Surv Ophthalmol*, 38: 149 – 164
2. **Beranová, M.**, Tonar, Z. (2002) : Principy a příklady imunochemie, Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni
3. **Bergmanson, J.P.G.**, Sheldon, T.M., Goosey J.D. (1999): Fuchs' dystrophy: a fresh look at an aging disease, *Ophthal Physiol Opt*, 19: 210 - 222
4. **Biswas, S.**, Munier, F.L., Yardley, J., Hart-Holden, N., Perween, R., Cousin, P., Suthpin, J.E., Noble, B., Batterbury, M., Kielty, C., Hackett, A., Bonshek, R., Ridgway, A., McLeod, D., Sheffield, V.C., Stone, E.M., Schorderet, D.F., Black, G.C.M. (2001): Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy, *Hum Mol Genetics*, 21: 2415 - 2423
5. **Bonnano, J.A.** (2003): Identity and regulation in ion transport mechanisms in corneal endothelium, *Prog Retin Eye Res*, 22: 69 - 94
6. **Bourne, W.M.**, Nelson, L.R., Hodge, D.O. (1997): Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38: 779 - 782
7. **Brady, S.E.**, et al. (1989): Clinical indications for and procedures associated with penetrating keratoplasty, *Am J Ophthalmol*, 108: 118 - 122
8. **Brown, J.C.**, Timpl, R. (1995): The collagen superfamily, *Int Arch Allergy Immunol*, 107: 484 – 490
9. **Cibis, G.W.**, Krachmer, J.A., Phelps, C.D., Weingeist, T.A. (1977): The clinical spectrum of posterior polymorphous dystrophy, *Arch Ophthalmol*, 1977: 1529 - 1537
10. **Feder, R.S.**, Kshetry, P. (2005): Noninflammatory ectatic disorders , In: Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E.J. (eds): *Cornea* (2nd edition), Elsevier MOSBY Inc.: 955 - 966
11. **Gibson, I.K.** (1994): Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus, In Smolin, G., Thoft, R. A.: *The Cornea: scientific foundations and clinical practice* (3rd edition), Little, Brown and co., Boston etc.: 9 – 24
12. **Gibson, I.K.**, Spurr – Michaud, S.J., Tisdale, A.S. (1987): Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea, *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 28: 212 - 220

- 13. Gottsch, J.D.,** Zhang, Ch., Sundin, O.H., Bell, W.R., Stark, W.J., Green, W.R. (2005a): Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in a L450W mutant of the COL8A2 gene, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 4504 – 4511
- 14. Gottsch, J.D.,** Sundin, O.H., Liu, S.H., Jun, A.S., Broman, K.W., Stark, W.J., Vito, E.C.L., Narang, A.K., Thompson, J.M., Magovern, M. (2005b): Inheritance of a novel COL8A2 mutation defines a distinct early-onset subtype of Fuchs corneal dystrophy, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 1934 – 1939
- 15. Greenhill, N.S.,** Ruger, B.M., Hasan, Q., Davis, P.F. (2000): The $\alpha 1$ (VIII) and $\alpha 2$ (VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo, *Matrix Biol*, 19: 19 – 28
- 16. Grupenmacher, L.** (2007): Corneal implants: expanding indications, *Ophthalmology Times Europe*: 12 - 13
- 17. Gwilliam, R.,** Lišková, P., Filipec, M., Kmoch, S., Jirsová, K., Bhattacharya, S.S., Hardcastle, A.J., Deloukas, P., Ebenezer, N.D. (2005): Micro heterogeneity in Czech families with posterior polymorphous corneal dystrophy mapping to chromosome 20p11.2 and the exclusion of the candidate gene VSX1, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 4480 - 4484
- 18. Hamada, R.,** Giraud, J.P., Graf, B., Pouliquen, Y. (1972): Analytical and statistical study of the lamellae, keratocytes and collagen fibrils of the central region of the normal human cornea (light and electron microscopy), *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol*, 32: 563 – 570
- 19. Héon, E.,** Mathers, W.D., Alward W.L.M., Weisenthal, R.W., Sunden, S.L.F., Fishbaugh, J.A., Taylor Ch.M., Krachmer J.H., Scheffield, V.C., Stone, E.M. (1995): Linkage of posterior polymorphous dystrophy to 20q11, *Hum Mol Genetics*, 3: 485 - 488
- 20. Hopfer, U.,** Fukai, N., Hopfer H., Wolf, G., Joyce, N., Li, E., Olsen, B.R. (2005): Targeted disruption of COL8A1 and COL8A2 genes in mice leads to anterior segment abnormalities in the eye, *The FASEB Journal*, 19: 1232 – 1244
- 21. Ihanamäki, T.,** Pelliniemi, L.J., Vuorio, E. (2004): Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye, *Ret Eye Res*, 23: 403 - 434
- 22. Jander, R.,** Korsching, E., Rauterberg, J. (1990): Characteristics and in vivo occurrence of type VIII collagen, *Eur J Biochem*, 189: 601 – 607
- 23. Kadler, K.E.,** Holmes, D.F., Trotter, J.A., Chapman, J.A. (1996): Collagen fibril formation, *Biochem J*, 316: 1 – 11

- 24. Kenney, M.C.,** Nesburn, A.B., Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Ljubimov, A.V. (1997): Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas, *Cornea*, 16: 345 – 351
- 25. Kapoor, R.,** Sakai, L.Y., Funk, S., Roux, E., Bornstein, P., Sage, H.E. (1988): Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices, 5: 721 – 730
- 26. Kivirikko, K.I.** (1993): Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases, *Ann Med*, 25: 113 – 126
- 27. Krafchak, C.M.,** Pawar, H., Moroi, S.E., Sugar, A., Lichter, P.R., Mackey, D.A., Mian, S., Nairus, T., Elner, V., Schteingart, M.T., Downs, C.A., Kijek, T.G., Johnson, J.M., Trager, E.H., Rozsa, W.F., Ali Mandal, M.N., Epstein, M.P., Vollrath, D., Ayyagari, R., Boehnke, M., Richards, J.E. (2005): Mutation in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells, *Am J Hum Genet*, 77: 694 – 708
- 28. Krachmer, J.H.** (1985): Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis, *Trans Am Ophthalmol Soc*, 83: 413 – 475
- 29. Krachmer, J.H.,** Feder, R.S., Belin, M.W. (1984): Keratokonus and related noninflammatory corneal thinning disorders, *Surv Ophthalmol*, 28: 293 - 322
- 30. Kraus, H. a kol.** (1997): *Kompendum očního lékařství* (1. vydání), Grada Publishing, Praha: 89 - 96
- 31. Levy, S.G.,** Moss, J., Sawada, H., Dopping-Hepenstal, P.J.C., McCartney, A.C.E. (1995): The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased Descemet's membrane, *Curr Eye Res*: 45 – 51
- 32. Ljubimov, A.V.,** Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Michael, A.F., Sun, T.T., Kenney, M.C. (1995): Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms, *Lab Inv*, 72: 461 – 473
- 33. Ljubimov, A.V.,** Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Couchman J.R., Wu, R.R., Ninomiya, Y., Sado, Y., Maguen, E., Nesburn, A.B., Kenney, M.C. (1996): Extracellular matrix aberrations in human corneas with bullous keratopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 997 - 1007
- 34. Marshall, G.E.,** Konstas, A.G., Lee, W.R. (1993): Collagens in ocular tissue, *Brit J Ophthalmol*, 229: 157 – 163

- 35. Meek, K.M.,** Boote, C. (2004): The organization of collagen in the corneal stroma, *Exp Eye Res*, 78: 503 – 512
- 36. Michelacci, Y.M.** (2003): Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix, *Braz J Med Biol Res*, 36: 1037 – 1046
- 37. Murray, K.R.,** Granner, D.K., Mayes, P.A, Rodwell, V.W. (1993): Harperova biochemie, 23. vydání, Appelton & Lange, East Norwalk, Connecticut: 668 - 671
- 38. Myllyharju, J.,** Kivirikko, K.I. (2001): Collagens and collagen-related diseases, *Ann Med*, 33: 7 – 21
- 39. Nishida, T.** (2005): Cornea, In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. (eds): *Cornea* (2nd edition), Elsevier MOSBY Inc.: 3 – 26
- 40. Pinelli, R.,** Mometto, C. (2007): Corneal epithelium: should it stay or should it go, *Ophthalmology Times Europe*: 18 - 19
- 41. Pitrová, Š.** (2002): Syndrom suchého oka, *Syndrom suchého oka*, 1: 3 – 9
- 42. Prockop, D.J.,** Kivirikko, K.I. (1995): Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy, *Annu Rev Biochem*, 64: 403 - 434
- 43. Richardson, W.P.,** Hettinger, M.E. (1985): Endothelial and epithelial-like cell formation in a case of posterior polymorphous dystrophy, *Arch Ophthalmol*, 103: 1520 - 1524
- 44. Rolando, M.,** Zierhut, M. (2001): The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease, *Surv Ophthalmol*, 45 (Suppl 2): 203 – 210
- 45. Rolando, M.,** Refojo, M.F., Kenyon, K.R. (1985): Tear water evaporation and eye surface diseases, *Ophthalmologica*, 190: 147 - 149
- 46. Ruger, B.M.,** Dunbar, P.R., Hasan, Q., Sawada, H., Kittelberger, R., Greenhill, N., Neale, T.J. (1994): Human mast cells produce type VIII collagen in vivo, *Int J Exp Path*, 75: 397 – 404
- 47. Sage, H.,** Trueb, B., Bornstein, P. (1983): Biosynthetic and structural properties of endothelial type VIII collagen, *J Biol Chem*, 258: 13391 - 13401
- 48. Sawada, H.,** Konomi, H., Hirose, K. (1990): Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: Its relation to type VIII collagen, *J Cell Biol*, 110: 219 - 227
- 49. Seiler, T.,** Hafezi, F. (2006): Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line, *Cornea*, 25: 1057 – 1059
- 50. Shervin, T.,** Brookes, N.H. (2004): Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis, *Clin Experiment Ophthalmol*, 32: 211 - 217

- 51. Shuttleworth, A.C.** (1997): Type VIII collagen, *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1145 – 1148
- 52. Tschuchiya, S.,** Tanaka, M., Konomi, H., Hayashi, T. (1986): Distribution of specific collagen types and fibronectin in normal and keratoconus corneas, *Jpn J Ophtalmol*, 30: 14 - 31
- 53. Ushiki, T.** (2002): Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint, *Arch Histol Cytol*, 65:109 – 126
- 54. Weisenthal, R.W.,** Streeten. B. (2005):Posterior membrane dystrophies, In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. (eds): *Cornea* (2nd edition), Elsevier MOSBY Inc.: 929 - 948
- 55. Wollensak, G.,** Spoerl, E., Reber, F., Seiler, T. (2004): Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro, *Eye*, 18: 718 – 722

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Kateřině Jirsové, Ph.D. za odborné vedení, MUDr. Vieře Veselé, Mgr. Stanislavě Merjavé a celému kolektivu Laboratoře biologie a patologie oka a Oční tkáňové banky VFN a 1. LF UK Praha za vstřícné jednání a pomoc při vypracovávání této práce.