Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

DETEKCE CYTOKERATINŮ VE ZDRAVÉ ROHOVCE A SPOJIVCE

(STUDIE JE SOUČÁSTÍ VÝZKUMU HODNOTÍCÍHO ZMĚNY A VÝZNAM EXPRESE CYTOKERATINŮ PŘI RŮZNÝCH TYPECH ONEMOCNĚNÍ ROHOVKY A SPOJIVKY)

Bc. Michaela Tanzerová

Praha, 2007

Pracoviště: Laboratoř biologie a patologie oka 1. LF UK a Oční tkáňová banka VFN.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Kateřina Jirsová, PhD.

Prohlášení

Tuto práci jsem zpracovala samostatně jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucí diplomové práce.

Detekce cytokeratinů ve zdravé rohovce a spojivce

SHRNUTÍ

Cíl: Cílem této práce byla imunohistochemická charakterizace výskytu cytokeratinů 1 až 20 ve zdravé lidské rohovce, limbu a spojivce. Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda přítomnost cytokeratinu 7 může být márkrem deficience limbálních kmenových buněk.

Materiál a metody: Pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie na kryořezech byl detekován výskyt cytokeratinů v jednotlivých vrstvách kontrolní rohovky, limbu a spojivky. Nepřímou fluorescenční imunohistochemií na membránách Millicell byl sledován výskyt cytokeratinu 7 na povrchu epitelu zdravé rohovky a spojivky a epitelu rohovky a spojivky získaných od pacientů s deficiencí limbálních kmenových buněk.

Výsledky: V epitelu rohovky byla prokázána přítomnost pro rohovku specifického cytokeratinu 3/12, dále jsme detekovali cytokeratiny charakteristické pro jednoduchý epitel (cytokeratiny 8, 18, 19), pro vrstevnatý epitel (cytokeratiny 4, 5, 13, 14), charakteristické pro hyperproliferaci (cytokeratin 16). V epitelu limbu se nacházely cytokeratiny charakteristické pro jednoduchý epitel (cytokeratiny 8, 18, 19), pro vrstevnatý epitel (cytokeratiny 4, 5, 13, 14, 15) a pro rohovku specifický cytokeratin 3/12. V epitelu spojivky byly pozitivní cytokeratiny charakteristické pro jednoduchý epitel (cytokeratiny 7, 8, 18, 19), pro vrstevnatý epitel (cytokeratiny 4, 5, 13, 14, 15), dále jsme detekovali pro rohovku typický cytokeratin 3/12. Endotel rohovky byl kromě cytokeratinů 8 a 18 negativní. Ve stromatu rohovky, limbu a spojivky cytokeratiny nebyly detekovány.

Na vzorcích od pacientů s deficiencí limbálních kmenových buněk jsme v epitelu rohovky lokalizovali cytokeratin 7.

Závěr: Cytokeratiny byly lokalizovány ve zdravé rohovce, limbu a spojivce. Znalost této lokalizace v jednotlivých vrstvách tkání umožňuje použití cytokeratinů jako specifických márkerů při určení různých patologických stavů rohovky s předpokládanými změnami v expresi a výskytu cytokeratinů. Cytokeratin 7 je márkrem epitelu povrchu

spojivky a tedy i márkrem přerůstání spojivkového epitelu přes rohovku, ke kterému dochází při deficienci limbálních kmenových buněk.

Klíčová slova: rohovka, limbus, spojivka, epitel povrchu oka, cytokeratiny, deficience limbálních kmenových buněk, nepřímá fluorescenční imunohistochemie, otisková cytologie.

The characterization of the healthy cornea, limbus and conjunctiva

Purpose: The aim of this work was to characterize the spectrum of cytokeratin 1 - 20 expression in healthy cornea, limbus and conjunctiva. The next aim was to determine whether the expression of cytokeratin 7 can be a marker of limbal stem cell deficiency.

Materials and methods: The spectrum of cytokeratins was studied using immunofluorescent staining of cryosections from healthy cornea, limbus and conjunctiva. The expression of cytokeratin 7 was detected by immunofluorescent staining on Millicell membranes. The epithelium of healthy cornea and conjunctiva and the epithelium of the cornea and conjunctiva of patients suffering from limbal stem cell deficiency were assessed.

Results: The typical corneal cytokeratin 3/12 was present in the corneal epithelium. Cytokeratins characteristic of simple epithelium (cytokeratins 8, 18, 19), stratified epithelium (cytokeratins 4, 5, 13, 14) and hyperproliferation (cytokeratin 16) were also present in the human cornea. The limbal epithelium was positive for cytokeratins characteristic of simple epithelium (cytokeratins 8, 18, 19), stratified epithelium (cytokeratins 4, 5, 13, 14, 15) and the cornea-specific cytokeratin 3/12. The conjunctival epithelium showed immunostaining for cytokeratins characteristic of simple epithelium (cytokeratins 7, 8, 18, 19), stratified epithelium (cytokeratins 4, 5, 13, 14, 15) and cytokeratin 3/12. Cytokeratins 8 and 18 were present in the corneal endothelium, while the stroma was negative for all cytokeratins.

The overgrowth of the conjunctival epithelium over the corneal epithelium was detecting in specimens obtained from patients with limbal stem cell deficiency using antibodies against cytokeratin 7.

Conclusion: The localization of cytokeratins in healthy cornea, limbus and conjunctiva shows a typical expression in individual epithelial layers. This indicates that cytokeratins may be used as specific markers for the diagnosis of cornea pathologies. Cytokeratin 7 is a marker for the superficial conjuntival epithelium, and its presence on the corneal surface can serve as a marker of limbal stem cell deficiency.

Key words: cornea, limbus, conjunctiva, epithelium of superficial eye, cytokeratin, limbal stem cell deficiency, immunofluorescent staining, impression cytology.

1. OBSAH

1. Obsah 7
2. Seznam zkratek 9
3. Úvod 10
4. Přehled literatury 12
4.1. Anatomie rohovky, limbu a spojivky 13
4.1.1. Rohovka 13
4.1.2. Limbus 16
4.1.3. Spojivka 17
4.2. Intermediální filamenta 18
4.2.1. Struktura cytokeratinů 18
4.2.2. Výskyt cytokeratinů 20
4.2.3. Cytokeratiny v rohovce, limbu a spojivce 22
4.2.3.1. Rohovka 22
4.2.3.2. Limbus 22
4.2.3.3. Spojivka 23
4.2.4. Onemocnění s poruchami cytokeratinů projevující se v oblasti rohovky a spojivky 24
4.2.5. Deficience limbálních kmenových buněk 26
5. Materiál a metody 30
5.1. Příprava a získání vzorků 31
5.1.1. Příprava kryořezů 31
5.1.2. Příprava membrán Millicell 31
5.2. Použité vzorky 32
5.2.1. Vzorky pro nepřímou fluorescenční imunohistochemii na kryořezech 32
5.2.2. Vzorky pro nepřímou fluorescenční imunohistochemii na membránách Millicell 33
5.3. Princip a metody imunohistochemie 35
5.3.1. Detekce cytokeratinů nepřímou fluorescenční imunohistochemii na kryořezech - protokol 38

5.3.2. Hodnocení přítomnosti CK na řezech 39
5.4. Otisková cytologie spojivky a rohovky 42
5.4.1. Detekce cytokeratinu 7 nepřímou fluorescenční metodou na membránách Millicell – protokol 44
5.4.2. Hodnocení membrán Millicell 44
6. Výsledky 46
6.1. Detekce cytokeratinů na kryořezech pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie 47
6.2. Detekce cytokeratinu 7 na povrchu zdravé rohovky a spojivky a na povrchu oka pacientů s DLKB 56
7. Diskuze 60
8. Závěr 65
9. Literatura 67

2. SEZNAM ZKRATEK

ABC	Avidin-biotin (komplex)
AEC	3-amino-9-ethylkarbazol
AM	Amniová membrána
APAAP	Alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (komplex)
BSA	Bovine serum albumin, bovinný sérový albumin
CK	Cytokeratin/y
DAB	3,3´-diaminobenzidin
DAPI	4,6-diamidino-2phenylindoldihydrochlorid
DLKB	Deficience limbálních kmenových buněk
DNA	Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleová kyselina
EB	Epidermolysis bullosa
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IF	Intermediální filamenta
K	Kontrolní vzorek
LKB	Limbální kmenové buňky
OCT	Optimal Cutting Temperature medium, medium pro zamrazování tkání
OC	Otisková cytologie
OL	Oko levé
OP	Oko pravé
P	Vzorek od pacienta
PAP	Peroxidáza-anti-peroxidázový (komplex)
PBS	Phosphate buffer saline, fosfátový pufr
PI	Propidium jodid
PK	Pachyonychie kongenitální
SABC	Streptavidin-biotin (komplex)
TAC	Transient amplyfying cells
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanate

3. ÚVOD

Intermediální filamenta tvoří hlavní složku cytoskeletu a významně se podílejí na růstu, diferenciaci, integritě tkání i funkčnosti buňky. Cytokeratiny jsou intermediální filamenta charakteristická pro epitelové buňky.

Změny v expresi či lokalizaci cytokeratinů se výrazně podílejí v patogeneze řady onemocnění. Vzhledem k jejich specifickému výskytu v tkáních, ale i během embryogeneze a diferenciace je lze použít jako diagnostické márkry. V lidské rohovce, limbu a spojivce se cytokeratiny vyskytují především v jejich epitelu. Charakterizace výskytu cytokeratinů včetně detailní lokalizace je podstatná nejen z hlediska poznání zdravé rohovky, limbu a spojivky, ale i z hlediska odhalení změn v těchto tkáních za různých patologických stavů.

Cílem této práce je:

1. imunohistochemická charakterizace výskytu jednotlivých cytokeratinů v lidské rohovce, limbu a spojivce.

2. zjištění, zda výskyt cytokeratinu 7 může být márkrem deficience limbálních kmenových buněk.

4. PŘEHLED LITERATURY

4.1. ANATOMIE ROHOVKY, LIMBU A SPOJIVKY

4.1.1. ROHOVKA

Rohovka je součástí pevného obalu oka, který pokrývá přibližně 20 % jeho povrchu. Rohovka je specializovaná refrakční průhledná a avaskulární tkáň, která je bohatě inervována. Hlavní funkcí rohovky je společně se sklérou udržovat stálý tvar oka, ochránit před mechanickým poškozením a zabránit vstupu infekce. Normální průměr rohovky je 10 - 12 mm, centrální tloušťka je přibližně 0,52 mm, tloušťka v periferii je 0,65 - 1 mm, což je dáno různými poloměry zakřivení přední a zadní plochy rohovky. Výživa rohovky probíhá především pomocí komorové tekutiny, (Kraus et al. 1997, Nishida et al. 2005).

Rohovka se skládá z šesti vrstev: epitelu, bazální membrány, Bowmanovy vrstvy, stromatu, Descemetovy membrány, endotelu, (Obr. 1).

Obr. 1: Řez lidskou rohovkou (parafinový řez, barvení Harrishovým hematoxylinem, archiv Laboratoře biologie a patologie oka).

Slzný film pokrývá rohovku a spojivku a udržuje hladký povrch epitelu. Je silný 7 - 10 μm a skládá se ze tří vrstev: povrchové lipidové vrstvy (0,1 μm), vodní vrstvy (7 μm) a mukózní vrstvy (0,02 - 0,05 μm), (Holly et al. 1977). Obsahuje množství biologicky aktivních látek: elektrolyty, kyslík, glukózu, imunoglobuliny, laktoferin, lysozym, albumin, histamin, prostaglandiny, růstové faktory a cytokiny. Hlavní funkcí slzného filmu je ochrana a zvlhčování povrchu oka, slouží i jako zdroj živin, podílí se na odstranění bakterií a odloučených epitelových buněk.

Rohovkový epitel vytváří ochrannou bariéru před mechanickým poškozením a vstupem infekce do oka. Rohovkový epitel je nerohovatějící, vícevrstevnatý, dlaždicový, o tloušťce 50 - 52 μm a skládá se z 5 - 7 vrstev. Povrch epitelu je tvořen ze 2 - 3 vrstev terminálně diferencovaných buněk, tyto buňky jsou ploché polygonální. Jejich povrch je pokryt mikroklky; tím se zvyšuje plocha pro vstřebání živin a kyslíku ze slzného filmu. Mají nízkou metabolickou aktivitu a obsahují málo cytoplazmatických organel a RNA. Buňky jsou spojené desmozomy a těsnými spojeními (gap junction). Proces diferenciace nově vznikajícího povrchu rohovky trvá přibližně 7 až 14 dní, (Dua et al. 2000). Epitel rohovky (zejména při rozsáhlejším poškození) se obnovuje i na základě dělení kmenových buněk, které se nacházejí v limbu – hraniční zóně mezi rohovkou a spojivkou. Pod vrstvou povrchových buněk se nacházejí dvě až tři vrstvy buněk kubických. Tyto buňky jsou v přechodném stavu diferenciace mezi bazálními a povrchovými buňkami. Jsou spojeny desmozomy a těsnými spojeními, množství organel je nízké. Vnitřní vrstva epitelu je složena z bazálních cylindrických buněk, které jsou pevně připojeny k bazální membráně fibrilami a hemidesmozomy. Navzájem jsou bazální buňky spojeny desmozomy, těsnými spoji a adherentními spoji (zonula adherens), (Nishida et al. 2005). Epitel poskytuje vnější ochranu proti biologickému i chemickému poškození. Těsná spojení mezi sousedícími buňkami epitelu zabraňují pronikání chemických substancí hlouběji do vrstev rohovky. Složky cytoskeletu epitelu jsou aktinová filamenta, mikrotubuly a intermediální filamenta; jejich hlavní úloha je udržování tvaru a pohyblivosti buněk. V rohovkovém epitelu se vyskytují intermediální filamenta - cytokeratiny, které tvoří hlavní proteinovou složku rohovkového epitelu. Především na periferii epitelu rohovky se nacházejí antigeny prezentující Langerhansovy buňky, které zajišťují imunologickou ochranu rohovky, (Gipson et al. 1994).

Bazální membrána epitelu rohovky je 50 nm silná a skládá se hlavně z kolagenu IV a lamininu, oba jsou produkty epitelových buněk. Dále obsahuje fibronektin, kolagen VII, fibrin a proteoglykany. Buňky epitelu jsou zakotveny pomocí hemidesmozomů. Bazální membrána má důležitou roli při hojení epitelu, udržuje polaritu epitelových buněk a je důležitá pro správnou funkci epitelu, (Nishida et al. 2005).

Bowmanova vrstva je asi 10 μm silná nebuněčná vrstva kolagenových fibril a proteoglykanů. Z kolagenů jsou zde přítomny typ I a III, dále pak typ VII podílející se na ukotvení bazálních buněk epitelu.Tato vrstva je považována za přední vrstvu stromatu. Předpokládá se, že funguje jako bariéra mezi buňkami stromatu a epitelu, která zároveň slouží jako podpora pro jeho správnou funkci, (Nishida et al. 2005). Bylo však prokázáno, že epitel může regenerovat i v případě, že Bowmanova vrstva chybí, (Gipson et al. 1994).

Rohovkové stroma je přibližně 500 μm tlustá vrstva, tvořící nejsilnější část rohovky - přibližně 90 %. Stroma je složeno z extracelulární matrix, keratocytů (stromální fibroblasty), a nervových vláken. Buněčná složka tvoří jen asi 2 - 3 % z celkového objemu, zbývající část objemu připadá na extracelulární složky - kolageny (především typu I, III, V a VI) a glykosaminoglykany. Kolagenové fibrily jsou shodné tloušťky (22,5 - 30 nm) a vzdálenost mezi nimi je také velmi stálá (41,4 ± 0,5 nm), (Hamada et al. 1976). Kolagenové fibrily v rohovkovém stromatu tvoří asi 300 paralelních lamel. Toto pravidelné uspořádání je hlavním předpokladem rohovkové transparence a zabezpečuje pronikání světelných paprsků do vnitřních prostor oka. Hlavním glykosaminoglykanem rohovky je keratan sulfát, dále chondroitin sulfát a dermatan sulfát. Glykosaminoglykany mají schopnost vázat a zadržovat velké množství vody. Za fyziologických podmínek stroma obsahuje asi 80 % vody. K zachování hydratace je bezpodmínečně nutná integrita endotelu, jinak by docházelo k prosakování komorové tekutiny do stromatu a tím ke vzniku edému a následně zákalu rohovky, (Nishida et al. 2005).

Descemetova membrána je bazální membrána endotelu, 8 – 12 μm tlustá. Je tvořena především kolagenem typu IV, VIII, lamininem a fibronektinem, které jsou produkty buněk endotelu, (Kraus et al. 1997). V elektronovém mikroskopu lze rozlišit dvě oblasti; přední pruhovanou vrstvu (anterior banded layer), která má při narození asi 3

μm a její tloušťka ani struktura se během života nemění a zadní vrstvu (posterior nonbanded layer), která je amorfní a v průběhu života se zvětšuje na 8 - 10 μm, (Waring et al. 1982).

Endotel rohovky je složený z plochých buněk, uspořádaných do hexagonální mozaiky. Na rozdíl od rohovkového epitelu nemá endotel schopnost proliferace. Densita buněk endotelu po narození je asi 4000 – 5000 buněk/mm^2. Počet buněk endotelu s věkem klesá, se snižováním počtu buněk se buňky ztenčují a rozšiřují. Endotel se zásadně podílí na udržení hydratace rohovky. Proti pasivní hydrataci stromatu působí řada pasivních i aktivních mechanismů, například Na^+/K^+ ATPázová pumpa, která odčerpává vodu z rohovky, (Nishida, 2005).

4.1.2. LIMBUS

Limbus je tranzitní oblast mezi rohovkou a spojivkou. Limbus je složen z vrstevnatého squamózního, nerohovatějícího epitelu a stromatu. Na straně rohovky je ohraničen končící Bowmanovou vrstvou a Descemetovou membránou a na straně spojivky paralelní linií přibližně 1 mm periferně. Limbus obkružuje rohovku, podporuje její cévní zásobení a zásobení živinami.

V bazální vrstvě epitelu limbu se nacházejí kmenové buňky pro rohovkový epitel, (Dua et al. 2006). Kmenové buňky jsou uloženy ve Vogtových palisádách. Po asymetrickém dělení a diferenciaci se pohybují směrem do středu rohovky. Limbální epitel je strukturálně podobný rohovkovému. Kromě epitelu jsou přítomny melanocyty, ve zvýšené míře oproti rohovce Langerhansovy buňky. Epitel je tvořen 7 - 10 vrstvami, spojení mezi buňkami a buňkou a matrix je shodné jako v rohovce: těsné spojení, hemidesmozomy. Bazální buňky jsou menší a obsahují více mitochondrií než u rohovkového epitelu, (Gipson et al. 1994).

Tkáň pod epitelem limbu můžeme klasifikovat jako stroma, skládající se z kolagenů, proteoglykanů a glykoproteinů. Buněčné elementy obsahují fibroblasty, melanocyty, makrofágy, lymfocyty a plazmatické buňky, (Nishida et al. 2005).

4.1.3. SPOJIVKA

Spojivka je mukózní membrána, která kryje vnitřní horní a dolní víčko a pokračuje od limbu na povrch oka. Spojivková tkáň je tvořena nerohovatějícím squamózním epitelem s uvnitř uloženými pohárkovými buňkami. Do spojivkového epitelu vstupují kanálky ze žláz, které slouží slzným a lipidovým složkám udržujícím slznou vrstvu. Počet vrstev se liší podle regionu výskytu, od 2 - 3 na povrchu oka, až po 10 - 12 na víčkovém okraji. Buňky epitelu obsahují značný počet organel. Desmozomy a těsná spojení jsou podobného charakteru jako v ostatních částech povrchu očního epitelu, (Gipson et al. 1994).

Pohárkové buňky vmezeřené mezi buňkami epitelu spojivky produkují mucin, který se zásadně podílí na zvlhčení povrchu oka. Přítomnost pohárkových buněk v epitelu spojivky je hlavním rozdílem mezi epitelem spojivky a rohovky. Epitelové buňky spojivky se od epitelu rohovky liší i zastoupením cytokeratinů, (Donisi et al. 2003).

Stroma spojivky obsahuje hojné cévní zásobení, které je na rozdíl od rohovky a limbu bohatší na buňky imunitního systému, hojně jsou zastoupeny antigeny prezentující Langerhansovy buňky, (Nishida et al. 2005).

4.2. INTERMEDIÁLNÍ FILAMENTA

Intermediální filamenta (IF) jsou hlavní součástí cytoskeletu eukaryotických buněk. Průměrná velikost fibril je 10 nm. Intermediální filamenta se podílejí na tvorbě mezibuněčných kontaktů i intrabuněčné architektuře. IF regulují buněčnou motilitu a mechanickou integritu, (Pitz et al. 2002). Uplatňují se v regulačních procesech spojených s diferenciací buněk a jsou tkáňově specifické. Podle jejich složení, imunoreaktivity a výskytu v různých typech buněk se dělí do 5 hlavních skupin:

1. skupina **cytokeratinů**: charakteristická pro epitelové buňky,
2. skupina **vimentinu**: typická v mesenchymových buňkách,
3. skupina **desminu**: typická pro příčně pruhované svalové buňky, myokard a většinu hladkého svalstva,
4. skupina **neurofilament**: typická pro nervové buňky,
5. skupina **gliálního fibrilárního kyselého proteinu**: nachází se v astrocytech, ependymálních buňkách, Schwanových buňkách a oligodendrocytech, (Kivela et al. 1998).

IF typu vimentinu, desminu a gliálního fibrilárního kyselého proteinu jsou obvykle složeny pouze z jednoho typu podjednotkového proteinu. Cytokeratiny se skládají z více různých polypeptidů, (Moll et al. 1982).

4.2.1. STRUKTURA CYTOKERATINŮ

Cytokeratiny (CK) jsou intermediální filamenta epitelových buněk. Existuje více než 30 cytokeratinů, které se vyskytují v různých typech epitelů. Každý z CK je produktem odlišného genu. Klasifikace cytokeratinů byla provedena na základě molekulární hmotnosti (40 - 68 kDa) a izoelektrického bodu (5 - 8), (Moll et al. 1982). Jednotlivé CK se také liší svou antigenicitou. CK jsou stabilní a relativně rezistentní vůči degradaci. Každý typ epiteliální tkáně obsahuje 4 - 8 různých CK. Jednoduchý epitel přednostně exprimuje CK 8, 18, ale i CK 7, 17 a CK 19. Vrstevnatý epitel vykazuje v bazální vrstvě CK 5, 14 a 15 a v povrchové vrstvě CK 1, 10, ale i CK 4 a 13, (Upasani et al. 2003). CK obsahují velké množství epitopů, díky jimž je možné připravit velké

množství monoklonálních i polyklonálních protilátek. CK se dělí do dvou základních podskupin:

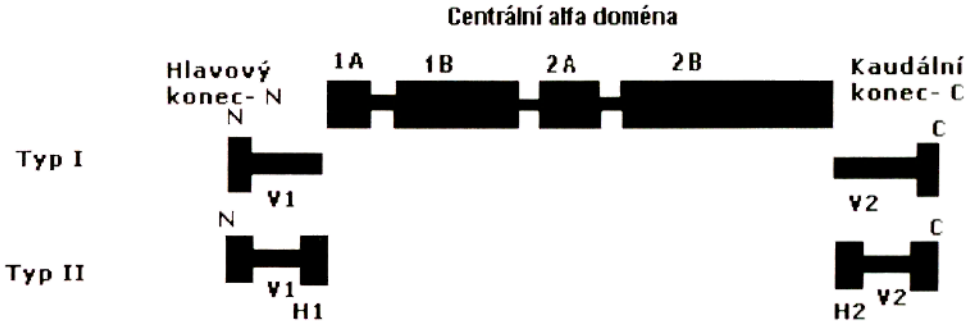
I. typ – kyselý: CK 9 - 20, geny se nacházejí na chromozomu 17 (17q12-q21).

II. typ – basický: CK 1 - 8, geny se nacházejí na chromozomu 12 (12q11q-14).

Výjimkou je CK 8, který odpovídá typu II, jeho gen se však nachází na chromozomu 12, (Smith et al. 2003).

CK tvoří většinou heterodimery obsahující CK I. a II. typu. Molekula CK, podobně jako ostatních IF, obsahuje dlouhý střední úsek - alfa helikální doménu, o délce 310 - 314 aminokyselinových zbytků, jehož sekvence je značně konzervativní. Na obou CK koncích je centrální doména ohraničena úsekem bez helikální konformace: hlavovou a kaudální doménou. Hlavová doména je amino konec, zatímco druhý konec je karboxylový. Na rozdíl od centrální domény jsou koncové domény variabilní, (Upasani et al. 2004), (Obr. 2).

Obr. 2: Struktura keratinových filament



Základní struktura CK, alfa-helikální část je rozdělena na čtyři domény, 1A, 1B, 2A a 2B. Ty jsou vzájemně spojeny krátkými úseky bez alfa-helikální struktury. Alfa-helikální doména je obklopena proměnlivou V1 a V2 doménou (amino- nebo karboxylový konec). Subdomény H1, H2 jsou v keratinech typu II, zpracováno podle Nečase et al. 1991.

4.2.2. VÝSKYT CYTOKERATINŮ

Cytokeratiny jsou typické pro buňky různých typů epitelu. Cytokeratiny 7, 8, 17, 18, 19 jsou přednostně exprimovány v jednoduchém epitelu, (Kivela et al. 1998). CK 7 a CK 19 jsou typické i pro žlázový epitel, (Pitz et al. 2002). Cytokeratiny typické pro vrstevnatý epitel jsou CK 1, CK 2e, CK 2p, CK 3 až CK 6 a CK 9 až CK 17. CK charakteristické pro bazální vrstvu buněk nerohovatějícího vrstevnatého epitelu jsou CK 5, CK 14, CK 15 a CK 19, pro vrstvu suprabazálních buněk CK 4 a CK 13. CK typické pro hyperproliferující epitel jsou CK 6 a CK 16, cytokeratiny vyskytující se v rohovatějícím a terminálně diferencovaném epitelu jsou CK 1 a CK 10, (Moll et al. 1982).

CK 1, 2 byl popsán v rohovatějícím epitelu na různých místech těla, v análním epitelu a exocervixu, (Moll et al. 1982). V epidermis se nacházejí v suprabazální vrstvě, (Nečas et al. 1991).

CK 3 se vyskytuje ve vícevrstevnatém epitelu a je charakteristický pro epitel lidské rohovky, (Pitz et al. 2002).

CK 4 až 6 existují v různém zastoupení v nerohovatějících vrstevnatých squamózních epitelech, dále v epitelu průdušek a vylučovacího systému, potních žlázách pokožky a v prsní žláze. CK 5 a CK 6 se vyskytují v epidermis a vlasových folikulech, (Moll et al. 1982).

CK 7, 8 jsou přítomny v jednoduchém epitelu, v trachee, urotelu močového měchýře. CK 8 je detekován ve vznikajícím embryonálním epitelu, (Moll et al. 1982).

CK 9, CK 10 a CK 11 nacházíme jen v epidermis. CK 9 je zvláště v kůži dlaní a na ploskách nohou, (Nečas et al. 1991).

CK 12 se nachází v lidské rohovce, kde tvoří pár s CK 3, (Kivela et al. 1998).

CK 13 je charakteristický pro suprabazální buňky nerohovatějícího vrstevnatého squamózního epitelu, např. sliznice jazyka, epitel análního kanálu, průdušnice, (Moll et al. 1982).

CK 14 se vyskytuje v epidermis v bazální vrstvě a nerohovatějícím vrstevnatém epitelu, (Moll et al. 1982).

CK 15 je přítomen ve vrstevnatém epitelu epidermis, také byl detekován v epitelu rohovky a spojivky, (Yoshida et al. 2006, Kasper et al. 1988).

CK 16 se nachází ve vrstevnatém epitelu sliznice, v epidermis se vyskytuje pouze v souvislosti se zánětlivým, hyperproliferativním a neoplastickým stavem, (Pitz et al. 2002).

CK 17 je obsažen ve vícevrstevnatém nerohovatějícím epitelu a myoepitelu, nachází se i v jednoduchém epitelu, (Nečas et al. 1991).

CK 18 má podobnou tkáňovou distribuci jako polypeptid 8. Byl popsán v jednoduchém epitelu. Může být márkrem řady neoplazií, (Fillies et al. 2006), včetně morfologické charakterizace nádoru, a společně s CK 8 i jeho prognostickým ukazatelem, (Oshima et al. 1996). CK 18 a CK 8 tvoří tkáňový polypeptidový antigen, který se používá k dlouhodobému monitorování choroby či sledování úspěšnosti léčby u karcinomu močového měchýře, plic, prostaty, vaječníků, dělohy, GIT, děložního čípku, ledvin, hlavy a krku. Společně s CK 8 a vimentimem se CK 18 vyskytuje u melanomů, (Chu et al. 1996).

CK 19 je charakteristický pro jednoduchý epitel a žlazový epitel, vyskytuje se i v nediferencovaných buňkách a v metaplastickém epitelu, (Lauweryns et al. 1993).

CK 20 je charakteristický pro gastrointestinální epitel, urotel, hojně je zastoupen v Merkelových buňkách, (Pitz et al. 2002).

4.2.3. CYTOKERATINY V ROHOVCE, LIMBU A SPOJIVCE

4.2.3.1. Rohovka

Cytokeratinový pár CK 3 a CK 12 je obecně považován za specifický márker rohovkového epitelu, (Chen et al. 1994). Zásadní význam má pro udržení integrity povrchu oka. CK 5 se v rohovce vyskytuje pouze v bazální vrstvě. CK 19 je exprimován v suprabazální vrstvě periferní části rohovky, v centrální části rohovky není přítomen. Přítomnost CK 8 a 18 v epitelu rohovky není jednoznačně určena, (Pitz et al. 2002). V rohovce byl popsán minoritní výskyt CK 4, 13, 14, 15 a 16, (Kivela et al. 1998). CK 13 byl nalezen hlavně v periferii rohovky, a to v povrchové vrstvě. Byla popsána exprese CK 14 hlavně v bazální vrstvě epitelu, (Kurpakus et al. 1994). Popsán je i výskyt CK 7 a 17. CK 7 se exprimuje v bazální vrstvě centrální části rohovky, (Pitz et al. 2002, Kivela et al. 1998).

Rohovkové stroma

V stromatu se cytokeratiny nevyskytují. Stroma obsahuje skupinu IF mesenchymového typu (vimentin), (Pitz et al. 2002).

Endotel rohovky

V endotelu rohovky je z IF nejhojněji zastoupen vimentin, (Pitz et al. 2002). Z CK byl v studiích detekován pár CK 8 a 18, (Kasper et al. 1992), zatímco v jiných studiích nebyl jejich výskyt potvrzen, (Kasper et al. 1988). Dále byl v endotelu popsán výskyt CK 7 a CK 19, (Foest et al. 1990), ale jiné studie přítomnost těchto CK nepotvrzují, (Kasper et al. 1992).

4.2.3.2. Limbus

CK 3 a CK 19 prokazují opačný směr v lokalizaci, centripetálně se zvyšuje výskyt CK 3, výskyt CK 19 se snižuje. V limbu jsou pozitivní povrchové buňky pro CK 3. CK 4, CK 13 jsou pozitivní jen v povrchových vrstvách limbu, (Lauweryns et al. 1993). CK 12 je exprimován v bazální vrstvě, zatímco CK 15 se vyskytuje i v suprabazální vrstvě limbu, (Yoshida, 2006).

4.2.3.3. Spojivka

Spojivkový epitel obsahuje většinu cytokeratinů charakteristických pro ostatní nerohovatějící vrstevnaté epitely, s převahou CK 4, 5, 13, 14, 15 a 19, s nižší expresí u CK 6, 10, 12, 16 a 17, (Pitz et al. 2002). CK 19 je homogenně distribuován všemi buňkami epitelu, (Kivela et al. 1998). Přítomnost páru CK 8 a 18 je nejasná. Krenzo a Freddo, (1997) odhalili pouze CK 8. V bazální vrstvě spojivky byly nalezeny CK 5 a 14, 15. Ostatní cytokeratiny vrstevnatého epitelu se nacházejí v suprabazální vrstvě spojivky, (Pitz et al. 2002).

Cytokeratiny rohovatějícího epitelu CK 1, 10, 11 se vyskytují v povrchových vrstvách s nepatrnou převahou v nasálním a temporálním kvadrantu, (Kivela et al. 1998). Jestli se ve spojivce vyskytuje CK 3 a CK 12, tak pouze ve velmi malém množství. CK 3 byl detekován v bazální vrstvě bulbární spojivky, (Kivela et al. 1998).

V pohárkových buňkách spojivky se exprimují CK 7 typický pro jednoduchý žlázový epitel a CK 8, 18 a 19, které jsou typické pro jednoduchý epitel, (Pitz et al. 2002).

4.2.4. ONEMOCNĚNÍ S PORUCHAMI CYTOKERATINŮ PROJEVUJÍCÍ SE V OBLASTI ROHOVKY A SPOJIVKY

Byly nalezeny mutace některých CK genů, které jsou příčinou různých onemocnění postihujících epidermis a další epitelové struktury orgánů či tkání, mezi které patří rohovka, (Irvine et al. 2005). CK mohou být použity pro hodnocení premaligních či maligních změn epitelů, (Van der Velden et al. 1999).

Mezi onemocnění, projevující se na povrchu oka způsobená mutací CK genů, patří následující choroby:

Epidermolysis bullosa (EB) je vzácné vrozené onemocnění způsobené mutací asi 11 genů. Je způsobeno trvalým poškozením soudržnosti mezi pokožkou a škárou, které vede k vytváření oblastí, kde dochází k odlupování kůže nebo vzniku puchýřů a oděrek, (Smith et al. 2003). Stejným způsobem jako kůže bývají postižené i sliznice. Známy jsou tři základní typy EB: simplex, junkční a dystrofická. U epidermolysis bullosa simplex dochází k tvorbě puchýřů jako následek cytolýzy bazálních keratinocytů. Puchýře se hojí rychle, na kůži zanechávají hypopigmentace nebo hyperpigmentace a vyskytují se i změny na nehtových ploténkách. U dystrofické EB je postižena lamina lucida bazální membrány, počet hemidesmozomů snížen nebo jsou defektní, stejně jako subbazální denzní ploténky a kotvící filamenta. U junkční EB se puchýře vyskytují pod lamina densa bazální membrány, jsou způsobeny defekty kotvících fibril a kolagenolýzou, (Ryynänen et al. 1991).

Epidermolysis bullosa často doprovází poškození oka: oční léze na víčkách, spojivce i rohovce. Zánět na víčkách může vést k lagoftalmu, při kterém snadněji vzniká expoziční keratitida. Při postižení spojivek někdy dochází ke srůstům ve spojivkovém fornixu a vzniku symblefar. Postižení rohovek a vznik erozí je bolestivé, po zhojení vznikají jizvy rohovky, které mohou zhoršovat vidění, (Sadowsky, 2005).

Mezi mutované geny patří i mutace genu pro CK 14. Následkem této mutace je snížení CK 14 v bazální vrstvě, u vážných forem CK 14 zcela chybí. Exprese CK 5, který tvoří heterodimer s CK 14, bývá snížena. CK 15, který je alternativním cytokeratinem buněk bazální vrstvy, byl zvýšen v důsledku snahy o kompenzaci nedostatku CK 14. Exprese CK 16, 17 a 19 v pokožce pacientů nebyla změněna, (Jonkman et al. 1996).

Kromě mutací v genech CK je toto onemocnění způsobeno i postižením kolagenu VII, (Chen et al. 2007).

Pachyonychie kongenitální (PK) je autosomálně dominantní onemocnění projevující se zbytněním nehtů provázené změnami na kůži a na sliznicích. PK se dělí na dva základní typy. Oba typy jsou způsobené mutací CK genů. Typ I vykazuje mutaci CK 6a a CK 16, typ II vykazuje mutaci v CK 6b a CK 17, (Smith et al. 2003).

Oční projevy zahrnují vznik katarakty a změny na rohovce, (Smith et al. 2003).

Meesmannova dystrofie je vzácné bilaterální autosomálně dominantně dědičné onemocnění rohovky. Projevuje se křehkostí předního epitelu rohovky, která vzniká na základě mikrocyst v rohovce. Ruptury mohou způsobit eroze rohovky, ty se pak mohou projevit fotofóbií nebo snížením zrakové ostrosti. Zřídka se objevuje nepravidelný astigmatismus jako následek subepiteliálního zjizevnatění. Histologicky se objeví disorganizačně zesílený epitel, s přítomností intraepiteliálních mikrocyst. Genetickým podkladem této dystrofie je mutace CK 3 a CK 12, (Corden et al. 2000).

Zadní polymorfní dystrofie rohovky je oboustranné, pomalu postupující onemocnění, s autosomálně dominantní dědičností postihující Descemetovu membránu a endotel rohovky, (Kraus et al. 1997). Buňky endotelu mění fenotyp na epitelový, dochází k proliferaci a přerůstání abnormálního endotelu přes trabekulární síťovinu, což může vést ke vzniku sekundárního glaukomu. V abnormálním endotelu se přednostně vyskytují CK 17 a CK 19. Mutace v genech pro CK nebyly popsány, (Jirsová et al. 2006).

Při epitelizaci endotelu dědičné Fuchsovy dystrofie a kongenitální hereditární endotelové dystrofie i nedědičného iridokorneálního syndromu taktéž dochází k výskytu CK 7, CK 8 a CK 18, (Hidayat and Cockerham, 2006).

4.2.5. DEFICIENCE LIMBÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

Limbální kmenové buňky

Limbální kmenové buňky (LKB) jsou relativně malé buňky s dlouhou životností, velkým proliferativním potenciálem a jsou zodpovědné za náhradu a regeneraci buněk rohovky, (Kozák et al. 2001, Lavker et al. 2004). LKB se dělí asymetricky. Asymetrické dělení znamená, že jedna dceřiná buňka zůstane kmenovou buňkou, zatímco druhá je určena k dělení a diferenciaci, (Donisi et al. 2003). LKB jsou uloženy v bazální vrstvě limbu ve Vogtových palisádách. Poškození epitelu stimuluje asymetrické dělení těchto buněk a jejich migraci centripetálně do epitelu rohovky na místo defektu, (Lavker et al. 2004). Během tohoto procesu dochází k organizované proliferaci a diferenciaci LKB buněk na TAC (transient amplyfying cells) a na terminálně diferencovaný rohovkový epitel. TAC se dělí častěji a mají konečný proliferativní potenciál, jsou uloženy především v bazální vrstvě epitelu rohovky, (Lavker et al. 2004).

Deficience limbálních kmenových buněk

K deficienci limbálních kmenových buněk (DLKB) dochází na základě primárního onemocnění či sekundárně na základě poškození buněk vnějšími faktory.

Mezi primární onemocnění vedoucí ke vzniku DLKB patří například dědičná aniridie, keratitis s mnohočetnou endokrinní deficiencí či neurotropní keratopatie, (Dua et al. 2000). K DLKB klinicky dochází na základě destrukce limbálních kmenových buněk, primární DLKB vzniklá v souvislosti s nedostatečnou stromální podporou jejich funkce, vede k hypofunkci a postupné ztrátě až absenci limbálních buněk, (Daniels et al. 2001).

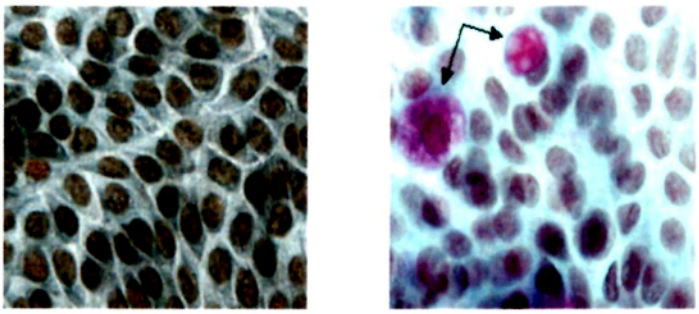
Sekundární poruchy jsou způsobeny destrukcí limbálních kmenových buněk vnějšími faktory (chemické nebo tepelné poranění, Stevens-Johnsnův syndrom, mnohočetné chirurgické zákroky, kryoterapie v oblasti limbu, nošení kontaktních čoček, vážné mikrobiální keratitidy), (Sridhar et al. 2000). Poškození funkce či absence LKB vede k poškození povrchu rohovky. Klinicky je charakterizováno opakujícími se epiteliálními defekty, přerůstáním spojivkového epitelu přes epitel rohovky, vaskularizací, chronickými záněty rohovky a ztrátě její čirosti, (Adams et al. 1988). DLKB se může projevovat vážnou fotofobií, slzením, ostrou bolestí způsobenou defekty

epitelu, snížením zrakové ostrosti, jizevnatěním, kalcifikací, v konečném stádiu oslepnutím, (Dua et al. 2000).

Klinicky se diagnostikuje DLKB na základě přerůstání spojivkového epitelu přes rohovkový epitel. Přerůstání spojivky přes rohovku používá i laboratorní diagnostika. Vychází z rozdílu mezi epitelem rohovky a spojivky; rohovka je tvořena pouze buňkami epitelu, (Obr. 3a), ve spojivce se nacházejí kromě epitelu i pohárkové buňky, (Obr. 3b).

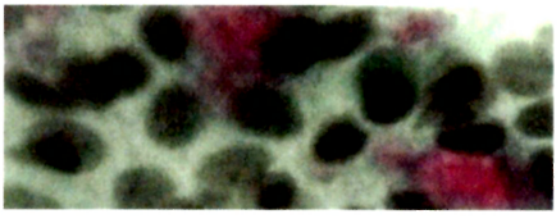
Obr. 3: Otisková cytologie povrchu zdravého oka: povrch rohovky je tvořen buňkami epitelu - a), povrch spojivky buňkami epitelu a pohárkovými buňkami (šipky) – b), (zvětšení 400x, barveno dle Gillse a Papanicolaoua, archiv Laboratoře biologie a patologie oka).

a) epitel rohovky **b) epitel spojivky**



Jednoznačně se DLKB diagnostikuje pomocí otiskové cytologie spojivky, (Nelson et al. 1988). Při méně rozsáhlém poškození spojivky se při DLKB nachází na povrchu poškozené rohovky spojivkový epitel s pohárkovými buňkami, (Obr. 4).

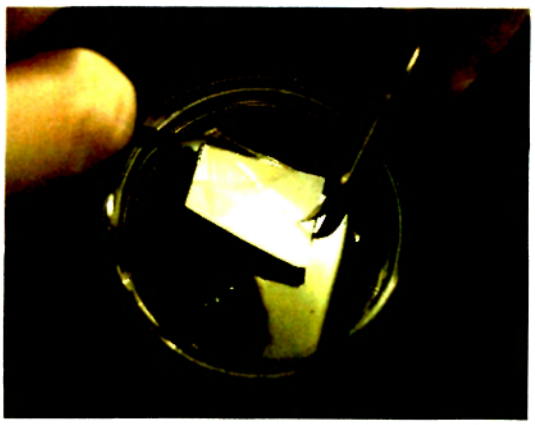
Obr. 4: Otisková cytologie povrchu oka pacienta po poleptání vápnem, (zvětšení 1000x, barvení dle Gillse a Papanicolaoua, archiv Laboratoře biologie a patologie oka).



V případě vážného poškození na povrchu oka dochází na spojivce ke vzniku squamózní metaplazie, při které dochází ke snížení počtu pohárkových buněk až k jejich vymizení. V tomto případě pak při DLKB dochází k přerůstání spojivkového epitelu bez pohárkových buněk, (Shridhar et al. 2001). K diagnostice je třeba využívat rozdílu mezi fenotypem rohovkového a spojivkového epitelu, například výskytem CK 3 a CK 19, (Donisi et al. 2003, Dua et al. 2000).

Pro léčbu DLKB je nutná obnova očního povrchu pomocí transplantace limbálních buněk. Snahou léčby je podpořit reepitalizaci rohovky poskytnutím stabilního epitelu, zabráněním regrese vzniku nových cév a obnovit průhlednost epitelu. Při částečné limbální deficienci kmenových buněk je efektivní metoda, kdy se mechanicky odstraní z rohovky spojivkový epitel, ten je pak nahrazen novým rohovkovým epitelem. Tuto metodu je možné použít proti migraci spojivkového epitelu, (Dua et al. 2000). U jednostranné limbální deficience lze použít autoštěp z druhého zdravého oka. U bilaterální poruchy je třeba získat buňky (tkáň) od příbuzného či zemřelého dárce (alloštěp) pro transplantaci LKB, (Daniels et al. 2001). Během zákroku se biopticky získaná tkáň limbu transplantuje do oblasti limbu příjemce, (Kenyon a Tseng, 1989, Lavker et al. 2004). Alternativou při rozsáhlém poškození rohovky příjemce DLKB je transplantace rohovky s následnou transplantací limbálních buněk a aplikací amniové membrány. Amniová membrána (AM), (Obr. 5) je tvořena silnou bazální membránou a avaskulární stromální matrix.

Obr. 5: Amniová membrána připevněná na nitrocelulózový papír, (archiv Laboratoře biologie a patologie oka).



Získává se z lidské placenty při porodu císařským řezem. Amniová membrána umožňuje migraci epitelových buněk, pevné uchycení bazálních buněk a podporuje diferenciaci epitelu. Membrána zabraňuje vzniku apoptózy a po její transplantaci se nevyskytují nepříznivé reakce z nepřijetí, (Dua et al. 1999).

5. MATERIÁL A METODY

5.1. PŘÍPRAVA A ZÍSKÁNÍ VZORKŮ

5.1.1. PŘÍPRAVA KRYOŘEZŮ

Vzorky byly získány z očních bulbů od dárců rohovky, které nemohly být použity k transplantaci. Rohovka s částí limbu a spojivky byla trepanovaná, získané terče byly rozděleny a použity pro přípravu kryořezů. Čtvrtina každého rohovkového terče byla zmražena a zalita do zamrazovacího média – OCT (Optimal Cutting Temperature), zmražena v tekutém dusíku a uchovávaná při teplotě -70°C. Pro pokusy jsme použili kryořezy o tloušťce 7 μm, které byly nalepeny po čtyřech na podložní skla ošetřená kamencovou želatinou. Kvalita preparátu se kontrolovala pod světelným mikroskopem. Do doby použití byla skla uchována při teplotě -20°C.

5.1.2. PŘÍPRAVA MEMBRÁN MILLICELL

Otisky z povrchu spojivky a rohovky byly získány pomocí membrán Millicell (Biopore MILLICELL®-CM membrány, PICM 01250, Millipore, velikost pórů 0,4 μm). Před odběrem byla membrána upravena; nůžkami byly odstraněny nožičky plastového držáku, aby plocha membrány pro snímání vzorku byla hladká. Vzorek byl získán přitištěním membrány na příslušnou tkáň po dobu 10 sekund. Obal Millicellové membrány byl označen číslem vzorku, místem odběru a pořadím daného odběru. Po odběru byly membrány uchovávány do doby jejich zpracování při teplotě -70°C.

5.2. POUŽITÉ VZORKY

5.2.1. VZORKY PRO NEPŘÍMOU FLUORESCENČNÍ IMUNOHISTOCHEMII NA KRYOŘEZECH

Pro detekci cytokeratinů pomocí fluorescenční imunohistochemie byly použity kontrolní vzorky rohovky, limbu a spojivky od sedmi dárců, (Tab. 1).

Tab. 1: Kontrolní vzorky použité pro detekci cytokeratinů (K1 – K7 vzorky dárců, věk dárce v době úmrtí, M - muž, Ž - žena).

číslo kontrolního vzorku	**věk dárce**	**pohlaví**
K1	38	M
K2	73	M
K3	49	M
K4	49	M
K5	74	Ž
K6	74	M
K7	68	M
průměrný věk dárce	60	

5.2.2. VZORKY PRO NEPŘÍMOU FLUORESCENČNÍ IMUNOHISTOCHEMII NA MEMBRÁNÁCH MILLICELL

Pro imunohistochemickou detekci CK 7 byly použity 4 kontrolní rohovky, (Tab. 2), a 7 kontrolních spojivek od 5 dobrovolných dárců, (Tab. 3), dále bylo použito 5 vzorků rohovek od 5 pacientů s poleptáním oka, (Tab. 4), u kterých byla klinicky potvrzena DLKB.

Tab. 2: Vzorky rohovek použité při detekci CK 7 (K: kontrolní vzorky rohovek, věk v době odběru, M - muž, OP - oko pravé, OL - oko levé).

číslo kontroly	**věk**	**pohlaví**
K1 OP	68	M
K1 OL 1	68	M
K1 OL 2	68	M
K2 OL	54	M

Tab. 3: Vzorky spojivky použité při detekci CK 7 (K: kontrolní vzorky spojivky, věk dárce při odběru, Ž - žena, OP - oko pravé, OL - oko levé, N - nasální kvadrant, T - temporální kvadrant).

číslo vzorku	**věk**	**pohlaví**
K1 OP/T	23	Ž
K1 OL/T	23	Ž
K1 OP/N	23	Ž
K2 OP/N	31	Ž
K3 OP/T	26	Ž
K4 OP/N	37	M
K5 OL	54	M

Tab. 4: Vzorky rohovek použité při detekci CK 7 (P1 – P5: rohovky pacientů, věk v době odběru, M - muž, OP - oko pravé, OL - oko levé).

číslo vzorku	**věk**	**pohlaví**
P1	39	M
P2	23	M
P3	33	M
P4	56	M
P5	54	M

5.3. PRINCIP A METODY IMUNOHISTOCHEMIE

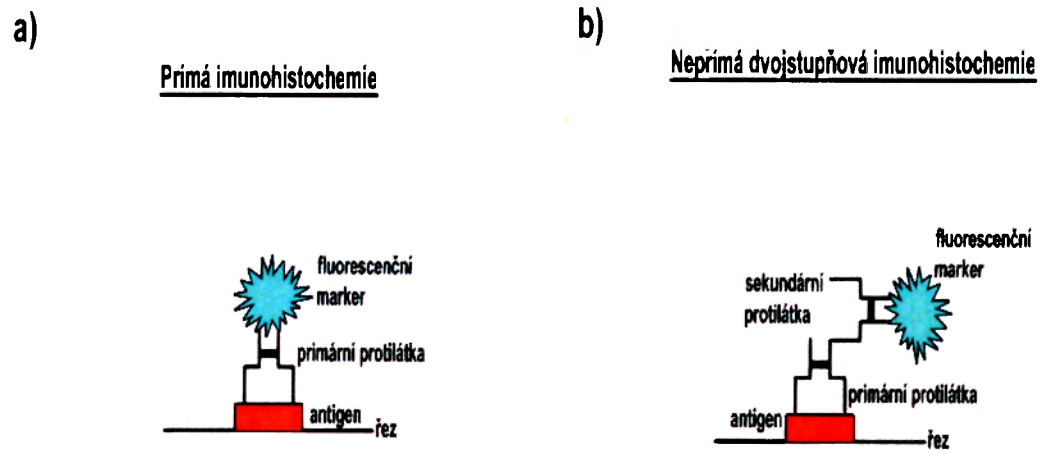
Základním cílem imunohistochemických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, tj. vazby antigenu a protilátky. Mezi základní typy imunohistochemických metod patří:

- přímá,
- nepřímá dvojstupňová,
- nepřímá trojstupňová imunochemická metoda.

Přímá imunohistochemie používá jen primární protilátky, které jsou přímo označeny (fluoresceinem, enzymem, kovem). Primární protilátka se váže na specifický epitop detekovaného antigenu, (Obr. 6a).

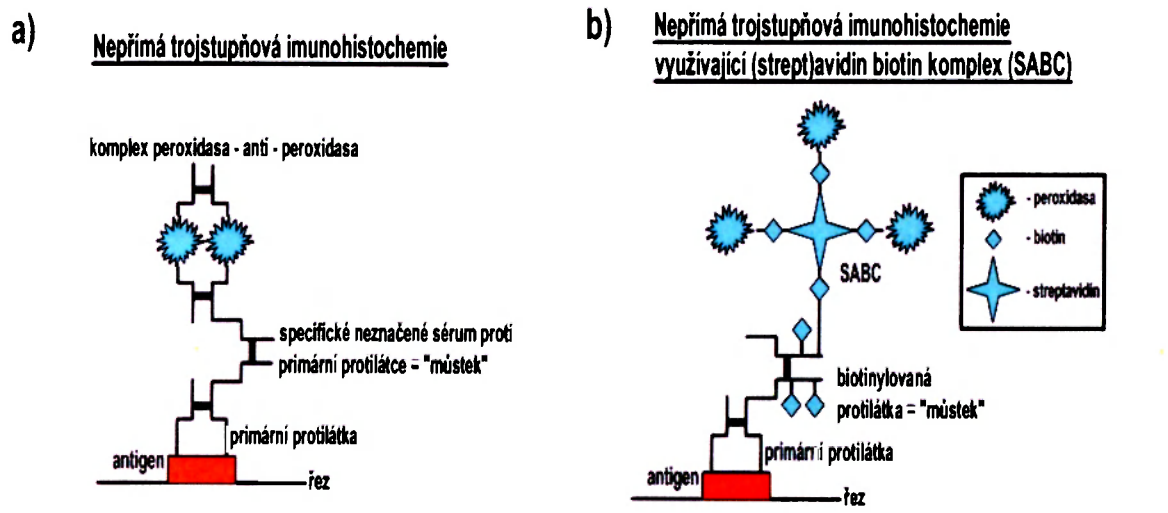
Nepřímá imunohistochemie je citlivější metoda, při které se nejprve aplikuje neoznačená protilátka (imunoglobin), která je specifická proti prokazovanému antigenu; jde o primární protilátku. Jako druhá je nanesena sekundární protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinu druhu, ze kterého je primární protilátka. Ta je značena (fluorochromem nebo enzymem) a imunologickou vazbou se naváže na primární protilátku, (Beranová et al. 2002), (Obr. 6b).

Obr. 6: Schéma přímé fluorescenční imunohistochemie – a), nepřímé dvojstupňové fluorescenční imunohistochemie – b), (zpracováno podle Beranové et al. 2002).



Nepřímá trojstupňová imunohistochemie se využívá k zesílení signálu v případě, kdy množství molekul detekovaného antigenu ve vzorku je nízké. První je nanesena protilátka, která reaguje s antigenem prokazovaným v tkáni. V dalším kroku je aplikována neznačená specifická protilátka proti imunoglobulinu druhu, který jsme použili v první fázi. Tato sekundární protilátka je také někdy označována jako spojovací protilátka a tvoří tzv. můstek. Dále nanášíme značený komplex; buď jde o **peroxidáza-anti-peroxidázový komplex** (PAP), (Obr. 7a), nebo alkalický **fosfatáza-anti-alkalieký fosfátový komplex** (APAAP). Další technika nepřímé trojstupňové imunohistochemie využívá **avidin-biotin komplexu** (ABC metoda), který má schopnost velmi pevné neimunologické a druhově nespecifické vazby avidinu s biotinem. Při použití avidinu získaného z bakterie Streptomyces avidini, nazýváme tento komplex **streptavidin-biotin komplex** (SABC), (Obr. 7b).

Obr. 7: Schéma nepřímé trojstupňové fluorescenční imunohistochemie – a), nepřímé trojstupňové imunohistochemie využívající (strept)avidin biotin komplex (SABC) - b), (zpracováno podle Beranové et al. 2002).



Obě metody ABC i SABC patří k nejcitlivějším a velmi rozšířeným metodám imunohistochemie. Princip spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho

následné vazby avidinem, resp. streptavidinem-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou. Křenová peroxidáza reaguje se svým substrátem, kterým je peroxid vodíku. Enzymatická aktivita peroxidázy pak indikuje místa v preparátu, kde došlo k primární specifické reakci. Je-li detekční komplex značený peroxidázou používáme jako chromogen 3,3´-diaminobenzidin (DAB). Oxidací DAB vzniká stabilní hnědý produkt, který detekujeme. Vedle DAB lze použít i jiné chromogeny, např. 3-amino-9-ethylkarbazol (AEC); detekovaný produkt je karmínově červené barvy, (Beranová et al. 2002).

Protilátky pro imunohistochemické metody

Polyklonální protilátky

Polyklonální látky jsou produktem aktivovaných klonů B lymfocytů. Slouží k detekci několika antigenů, nebo většímu počtu epitopů daného antigenu. Získávají se imunizací zvířete antigenem, při imunizaci dochází ke stimulaci B lymfocytů, proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky, (Beranová et al. 2002).

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produkovány B lymfocytárními hybridomy, které jsou získávány indukovanou fúzí imunních slezinných buněk a buněk myelomových linií. Monoklonální protilátky jsou zaměřené proti jedinému epitopu, proto jsou vysoce specifické, (Nečas et al. 1991).

5.3.1. DETEKCE CYTOKERATINŮ NEPŘÍMOU FLUORESCENČNÍ IMUNOHISTOCHEMIÍ NA KRYOŘEZECH - PROTOKOL

VZORKY: K1 - K7

Vzorky se nechají rozmrznout po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

FIXACE: 10 min. aceton

MŘÍŽKA: oddělení řezů na sklíčku pomocí PAP PEN pera (Immunotech), aby nedošlo ke smísení protilátek různých koncentrací či protilátky s negativní kontrolou.

OPLACH: PBS 2x 5 min.

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA: v 1% BSA (bovinní sérový albumin), inkubace 1 hod.

OPLACH: PBS 3x 5 min.

SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA: v 1% BSA v PBS, inkubace 1 hod.

OPLACH: PBS 3x 5 min.

OSCHNUTÍ

MONTOVÁNÍ: na každé podložní sklíčko se kápne Vectashied pro fluorescenci, a to Vectashied-PI (propidium iodide) nebo Vectashield-DAPI (4,6-diamidino-2phenylindoldihydrochlorid). PI či DAPI interkalují s DNA a slouží tak k jejímu zviditelnění. Po aplikaci montovacího média se vzorek překryje krycím sklíčkem. Vzorky se uschovávají při teplotě +8°C, do doby hodnocení, která by měla proběhnout do 24 - 48 hodin po vytvoření vzorku.

5.3.2. HODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI CK NA ŘEZECH

Vzorky byly pozorované a vyhodnocované pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus BX-51, zvětšení 200-400x). Dokumentační fotografie byly snímány pomocí kamery Vosskühler VDS CCD-1300CB (VDS Vosskühler GmbH, Německo), a analyzované v programu NIS-elements AR 2.30 (Laboratory Imaging, Česká republika). Fluorescenční signál byl sledovaný zvlášť v každé buněčné vrstvě rohovky, limbu a spojivky. Každý experiment byl provedený v duplikátu. Hodnotili jsme počet a intenzitu fluorescence pozitivních buněk podle následující stupnice:

Počet pozitivních buněk ve škále:

N0: 0 %,

N1: 1- 25 %,

N2: 26 - 50 %,

N3: 51- 75 %,

N4: 76 - 100 %,

Intenzita signálu ve škále:

0 – negativní,

1 – slabá intenzita,

2 – střední intenzita,

3 – silná intenzita,

4 – velmi silná intenzita.

Použité protilátky:

Pro rohovkové kryořezy byly použity protilátky reagující s jednotlivými typy CK a sekundární protilátky, dle Tab. 5 a 6.

Tab. 5: Přehled sledovaných antigenů a použitých primárních protilátek (CK - cytokeratin, monokl.- monoklonální, polykl.- polyklonální protilátky).

detekovaný antigen	protilátka	původ	firma	koncentrace
CK 1	anti – CK 1, polykl.	kozí	Santa Cruz Biotechnology, CA,USA	1:250
CK 2e	anti – CK 2e, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:50
CK 3/12	anti – CK 3/12, monokl.	myš	Research Diagnostic Inc., Flanders, NJ, USA	1:400
CK4	anti – CK 4, monokl.	myš	Sigma, St. Louis, USA	1:200
CK 5/6	anti – CK 5/6, monokl.	myš	Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko	1:40
CK 6	anti – CK 6, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:25
CK 7	anti – CK 7, monokl.	myš	Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko	1:50
CK 8	anti – CK 8, monokl.	myš	Chemicon International Inc., Temecula, USA	1:400
CK 9	anti – CK 9, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:20
CK 10	anti – CK 10, monokl.	myš	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:50
CK 10/13	anti – CK 10/13, monokl.	myš	Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko	1:25
CK 14	anti – CK 14, monokl.	myš	Chemicon International Inc., Temecula, USA	1:50
CK 15	anti – CK 15, monokl.	myš	Chemicon International Inc., Temecula, USA	1:100
CK 16	anti – CK 16, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:30
CK 17	anti – CK 17, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:25
CK 18	anti – CK 18, monokl.	myš	Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko	1:50
CK 19	anti – CK 19, monokl.	myš	Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko	1:50
CK 20	anti – CK 20, monokl.	myš	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Německo	1:20

Tab. 6: Přehled použitých sekundárních protilátek.

antigen	protilátka	původ	firma	marker	koncentrace
Kozí protilátka	IgG	opice	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA	FITC, klon: 705 095 003	1:150
Myší protilátka	IgG	opice		FITC, klon: 715 095 151	1: 500
Myší protilátka	IgG	prase		TRIC, klon: 515 025 003	1:150

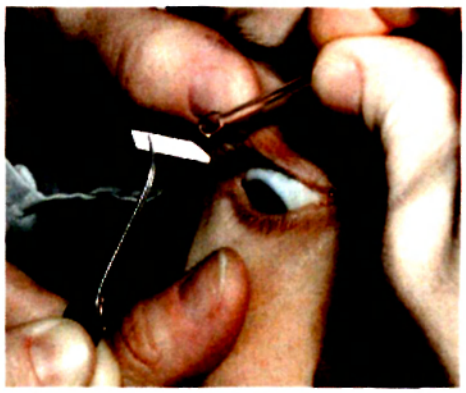
5.4. OTISKOVÁ CYTOLOGIE SPOJIVKY A ROHOVKY

Otisková cytologie (OC) je jednoduchá, neinvazivní a pacienta netraumatizující technika, při které přiložením vhodného materiálu (acetát celulózového filtru, membrány Millicell) na povrch spojivky nebo rohovky získáme spojivkový nebo rohovkový epitel pro jeho hodnocení, (Nelson et al. 1988). Pomáhá při diagnostice následujících poruch povrchu oka; syndrom suchého oka (squamózní metaplázie), deficience limbálních kmenových buněk, virová, alergická nebo zánětlivá keratokonjunktivitida, deficience vitaminu A, neoplázie povrchu oka, (McKelvie et al. 2003).

Poprvé tuto techniku popsal Egbert et al. v roce 1977, původní technika zahrnovala přitlačení proužku filtru z acetátcelulózy pomocí skleněné tyčinky na spojivku. Tato původní metoda byla postupně inovována, získané vzorky se barví většinou podle Papanicolaoua, (Papanicolaou, 1942). Pro detekci antigenů se provádí odběr na membrány typu Millicell, na nichž lze provést fluorescenční imunohistochemické vyšetření, (Calonge et al. 2004).

Vzorky se od pacientů získávají dle potřeby nejčastěji ze spojivky temporální, nasální, dolní bulbární a palpebrální, (Obr. 8), většinou bez použití lokálního anestetika. Při silném mrkacím reflexu, špatné přístupnosti odběrového místa či pro zvýšení komfortu pacienta je třeba aplikovat anestetikum (Benoxi 0,4 %) do dolního fornixu. Pro naše experimenty byly získány kontrolní vzorky z rohovky a z horní bulbární spojivky a to přitištěním membrány Millicell přibližně 10 vteřin na příslušné místo.

Obr. 8: Otisková cytologie spojivky, (archiv Laboratoře biologie a patologie oka).



Vzorky získané pomocí OC se morfologicky hodnotí: sleduje se typ přítomných buněk, jejich denzita, velikost a tvar, jádrocytoplazmatický poměr, přítomnost pohárkových buněk či přítomnost dalších buněčných typů, (Doughty et al. 2000).

Tato technika má výhodu, že nenarušuje strukturu limbálních kmenových buněk, uložených v bazální vrstvě limbálního epitelu, které jsou zodpovědné za obnovu rohovkového epitelu. Při biopsii mohou být limbální kmenové buňky poškozeny a jejich počet následně redukován, (Calongue et al. 2004).

5.4.1. DETEKCE CYTOKERATINU 7 NEPŘÍMOU FLUORESCENČNÍ METODOU NA MEMBRÁNÁCH MILLICELL - PROTOKOL

VZORKY: kontrolní rohovky K1 – K2; kontrolní spojivky K1 – K5, vzorky od pacientů P1 – P5.

FIXACE: koncentrovaný chlazený aceton se kápne na vzorek po dobu 1 min, membrána se sloupne z nosiče a vloží na kulaté krycí sklíčko (buňkami nahoru).

OPLACH: PBS 3x 5 min.

PERMEABILIZACE: 0,2% TRITON X 100.

OPLACH: PBS 3x 5 min.

BLOKOVÁNÍ: BSA 2,5% 20 min.

PRIM. PROTILÁTKA: v 0,1% BSA, inkubace 1 hod. při pokojové teplotě.

OPLACH: PBS 3x 5 min.

SEK.PROTILÁTKA: v 0,1% BSA, inkubace 1 hod. při pokojové teplotě. Chránit před světlem.

OPLACH: PBS 3x 5 min.

MONTOVÁNÍ: přenést membránu na podložní sklíčko, na každou membránu se kápne Vectashied pro fluorescenci, a to Vectashied-PI (propidium iodide). PI interkaluje s DNA a slouží tak k jejímu zviditelnění. Po aplikaci montovacího média se vzorek překryje krycím sklem. Vzorky se uschovávají při teplotě +8°C, do doby hodnocení, která by měla proběhnout do 24 - 48 hodin po vytvoření vzorku.

5.4.2. HODNOCENÍ MEMBRÁN MILLICELL

Vzorky jsme hodnotili stejným způsobem jako u předchozí metody. Vždy bylo hodnoceno 100 - 500 buněk dle jejich přítomnosti ve vzorku.

Použité primární a sekundární protilátky:

Pro nepřímou fluorescenční imunohistochemii na membránách Millicell byla použita primární protilátka reagující s CK 7 (monoklonální, myší anti CK 7, Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko, koncentrace 1:50) a sekundární protilátka - anti myší IgG

(Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA, FITC, klon: 715 095 151, koncentrace 1:500).

6. VÝSLEDKY

6.1. DETEKCE CYTOKERATINŮ NA KRYOŘEZECH POMOCÍ NEPŘÍMÉ FLUORESCENČNÍ IMUNOHISTOCHEMIE

Výskyt jednotlivých CK jsme sledovali v kontrolních řezech rohovky, limbu, spojivky (K1 - K7) pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie a hodnotili jejich přítomnost podle počtu a intenzity fluorescence pozitivních buněk (Tab. 7 - 10).

Tab. 7: Průměrné hodnoty K1 – K7 přítomnosti jednotlivých cytokeratinů (CK), v hodnocených vrstvách kontrolních rohovek (intenzita signálu: 0 - negativita, 1 slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná intenzita; min. - nejnižší hodnota přítomnosti CK ve vzorku, max. - nejvyšší hodnota přítomnosti CK ve vzorku).

ROHOVKA	vrstvy epitelu			stroma
	povrchová	suprabazální	bazální	
typ CK	*% pozitivních buněk / intenzita signálu, (min. – max. hodnoty)*			
CK 1	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 2e	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 3/12	76/3 (57-98)	68/2 (38-96)	64/2(23-96)	0/0
CK 4	72/3(15-100)	45/1(0-67)	20/1(0-41)	0/0
CK 5/6	83/2(63-80)	84/2(65-100)	85/2(65-100)	0/0
CK 6	3/1(0-20)	3/1(0-20)	0/0	0/0
CK 7	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 8	60/2(44-70)	43/1(20-67)	35/1(5-55)	0/0
CK 9	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 10	2/1(0-15)	0/0	0/0	0/0
CK 10/13	35/1(20-65)	22/1(5-45)	6/1(0-25)	0/0
CK 14	48/2(0-95)	67/2(50-95)	74/2(56-100)	0/0
CK 15	6/1(0-15)	5/1(0-13)	5/1(0-10)	0/0
CK 16	59/2(20-90)	70/2(30-100)	36/1(0-70)	0/0
CK 17	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 18	65/1(45-100)	73/1(55-90)	84/1(53-100)	0/0
CK 19	63/2(33-95)	52/1(25-95)	51/1(35-69)	0/0
CK 20	0/0	0/0	0/0	0/0

Pro rohovku typický CK 3/12 se vyskytoval ve všech vrstvách epitelu rohovky, signál byl středně až silně pozitivní. CK 5/6 se vyskytoval (silně pozitivní) ve všech vrstvách rohovky. CK 4 byl slabě pozitivní v bazální vrstvě, jeho pozitivita rostla směrem k povrchové vrstvě. Stejnou tendenci k zvyšování signálu od bazální vrstvy směrem k povrchu jsme zaznamenali i u CK 8. CK 10/13 jsme detekovali hlavně v povrchové a suprabazální vrstvě, kde byl slabě pozitivní. Přítomnost CK 14 klesala od bazální vrstvy směrem k povrchové vrstvě. Podobně je distribuován i CK 15, s průměrně 29 % pozitivních buněk v bazální vrstvě. CK 16 se nacházel ve všech vrstvách epitelu, dominantně v suprabazální vrstvě. CK 18 byl přítomen ve všech vrstvách epitelu s výraznějším výskytem v bazální vrstvě. CK 19 se vyskytoval v 50 % epitelu rohovky. CK 6 a CK10 byly slabě pozitivní, maximálně v 20 (15) % buněk povrchu rohovky. Epitel rohovky byl negativní pro CK 1, CK 2e, CK 7, CK 9, CK 17 a CK 20, (Obr. 9).

Tab. 8: Průměrné hodnoty přítomnosti jednotlivých cytokeratinů (CK), v hodnocených vrstvách kontrolních vzorků limbu (intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná intenzita, min. - nejnižší hodnota přítomnosti CK ve vzorku, max. - nejvyšší hodnota přítomnosti CK ve vzorku).

LIMBUS	**vrstvy epitelu**			**stroma**
	povrchová	**suprabazální**	**bazální**	
typ CK	*% pozitivních buněk / intenzita signálu, (min. – max. hodnoty)*			
CK 1	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 2e	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 3/12	51/2(25-85)	47/2(13-85)	14/1(5-33)	0/0
CK 4	52/2(7-80)	22/1(0-70)	0/0	0/0
CK 5/6	80/2(58-100)	81/2(60-100)	65/1(35-100)	0/0
CK 6	7/1(0-36)	4/1(0-26)	0/0	0/0
CK 7	5/1(0-35)	0/0	0/0	0/0
CK 8	48/1(30-65)	38/1(12-55)	41/1(12-65)	0/0
CK 9	0/0	0/0	0/0	0/0

CK 10	4/1(0-20)	1/1(0-5)	0/0	0/0
CK 10/13	45/2(10-90)	31/1(10-45)	4/1(0-13)	0/0
CK 14	37/2(0-69)	51/2(25-90)	82/2(55-100)	0/0
CK 15	4/1(0-16)	16/1(0-50)	29/1(7-75)	0/0
CK 16	2/1(0-8)	12/1(0-40)	0/0	0/0
CK 17	0/0	0/0	4/1(0-27)	0/0
CK 18	33/1(0-75)	24/1(0-60)	2/1(0-50)	0/0
CK 19	81/3(52-85)	62/2(35-65)	68/2(45-74)	0/0
CK 20	0/0	0/0	0/0	0/0

Ve všech vrstvách epitelu limbu byly exprimované CK 5/6, CK 8, CK 14 a CK 19. CK 5/6 a CK 19 se nacházely zejména v povrchových vrstvách, CK 14 byl dominantně detekován v bazální vrstvě, směrem k povrchu jeho pozitivita klesala. Dále byl detekován středně silný signál pro CK 3/12, CK 4 a CK 10/13 asi v 50 % buněk povrchové vrstvy, jejich pozitivita směrem k bazální vrstvě klesala. CK 15 se vyskytoval (slabě pozitivní signál) v 29 % buněk bazální vrstvy. CK 18 se nacházel slabě pozitivní asi v 33 % buněk povrchové vrstvy. Ojediněle byl zaznamenán signál pro CK 6 a CK 7 (v povrchové vrstvě) a CK 16 a 17. Epitel limbu byl negativní pro CK 1, CK 2e, CK 9 a CK 20, (Obr. 9).

Tab. 9: Průměrné hodnoty přítomnosti jednotlivých cytokeratinů (CK), v hodnocených vrstvách kontrolních spojivek (intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná intenzita, min. - nejnižší hodnota přítomnosti CK ve vzorku, max. - nejvyšší hodnota přítomnosti CK ve vzorku).

SPOJIVKA	**vrstvy epitelu**			**stroma**
	povrchová	**suprabazální**	**bazální**	
typ CK	*% pozitivních buněk / intenzita signálu, (min. – max. hodnoty)*			
CK 1	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 2e	0/0	0/0	0/0	0/0

CK 3/12	30/1(10-60)	32/1(7-55)	9/1(0-30)	0/0
CK 4	71/2(46-90)	54/2(15-85)	6/1(0-15)	0/0
CK 5/6	77/2(57-100)	80/2(62-100)	58/1(35-77)	0/0
CK 6	13/1(0-25)	8/1(0-35)	0/0	0/0
CK 7	34/1(10-65)	16/1(0-35)	9/1(0-35)	0/0
CK 8	54/2(36-70)	39/1(25-55)	37/1(5-50)	0/0
CK 9	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 10	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 10/13	67/3(38-100)	56/2(35-75)	13/1(0-30)	0/0
CK 14	52/1(0-90)	60/2(18-90)	79/2(50-100)	0/0
CK 15	20/1(0-57)	23/1(0-48)	39/1(15-55)	0/0
CK 16	0/0	3/1(0-18)	0/0	0/0
CK 17	0/0	0/0	0/0	0/0
CK 18	16/1(0-60)	3/1(0-25)	2/1(0-15)	0/0
CK 19	81/3(55-95)	62/2(20-85)	68/2(42-100)	0/0
CK 20	0/0	0/0	0/0	0/0

V epitelu spojivky jsme detekovali CK 14, který byl přítomen ve všech vrstvách epitelu s dominantním výskytem v bazální vrstvě (79 %). CK 5/6 a CK 19 se nacházely v 58 - 81 % buněk epitelu spojivky. CK 4 a 10/13 byly dominantně pozitivní v povrchové vrstvě epitelu spojivky (kolem 70 % buněk), pozitivita CK 4 a 10/13 se snižovala asi na 10 % směrem k bazální vrstvě. CK 8 se vyskytoval v 54 % buněk povrchového epitelu, v suprabazální a bazální vrstvě počet pozitivních buněk dosahoval téměř 40 %. CK 3/12 a CK 7 se vyskytovaly kolem 30 % buněk v povrchové a suprabazální vrstvě epitelu spojivky. CK 15 byl detekován v bazální vrstvě (39 %), jeho pozitivita klesala směrem k povrchovým buňkám, ve kterých byl signál slabě pozitivní (20 %). CK 18 se nacházel v povrchové vrstvě (16 %). CK 6 byl pozitivní (kolem 10 %) spíše v povrchových vrstvách, CK 16 byl detekován v suprabazální oblasti spojivkového epitelu. Buňky epitelu spojivky byly negativní pro CK 1, CK 2e, CK 9, CK 10, CK 17 a CK 20, (Obr. 9).

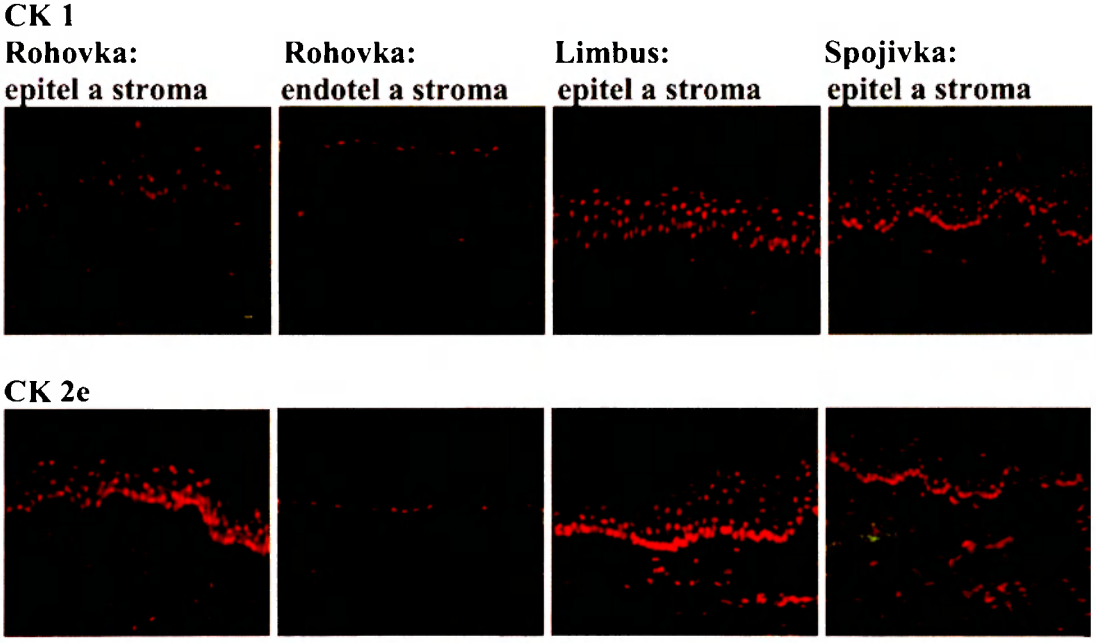
Tab. 10: Průměrné hodnoty přítomnosti jednotlivých cytokeratinů (CK), v endotelu kontrolních rohovek (N - % pozitivních buněk, I - intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná intenzita, min. - nejnižší hodnota přítomnosti CK ve vzorku, max. - nejvyšší hodnota přítomnosti CK ve vzorku).

ENDOTEL ROHOVKY																
CK	**1**	**2e**	**3/12**	**4**	**5/6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**10/13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
N/I	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	45/2 (10-70)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	19/1 (5-35)	0/0	0/0

Endotel rohovky byl pro všechny CK negativní, kromě CK 8 (45 %) a CK 18 (19 %), (Obr. 9).

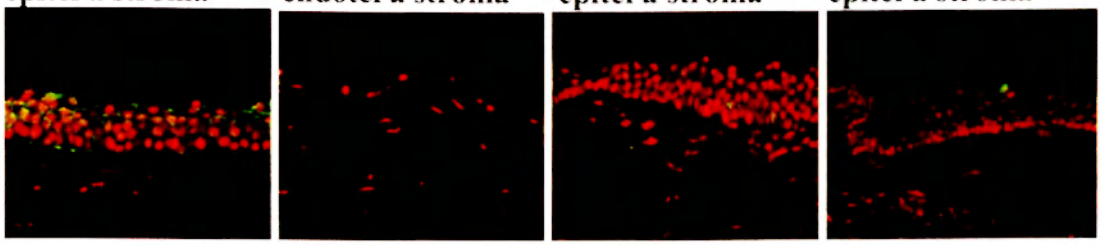
Ve stromatu rohovky, limbu a spojivky jsme přítomnost CK neprokázali (Obr. 9).

Obr. 9: Výskyt jednotlivých cytokeratinů (CK), které byly přítomny v epitelu rohovky, limbu, spojivky a endotelu. Signál pro jednotlivé cytokeratiny je zelený (FITC) jádra jsou červená (PI), výjimkou CK 14, kde je signál červený (TRIC) a jádra modrá (DAPI), (měřítko 10 μm).

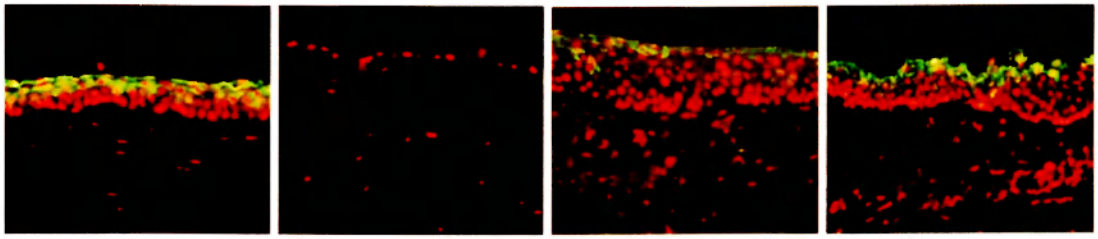


CK 3/12

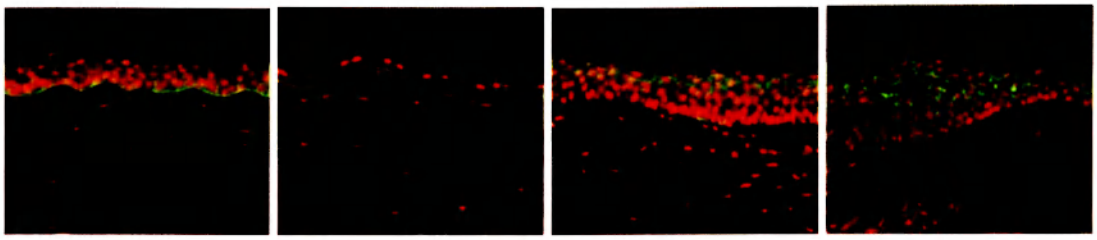
Rohovka: epitel a stroma	Rohovka: endotel a stroma	Limbus: epitel a stroma	Spojivka: epitel a stroma



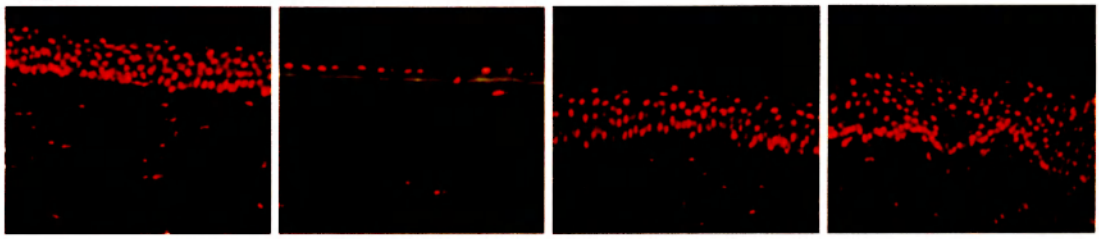
CK 4



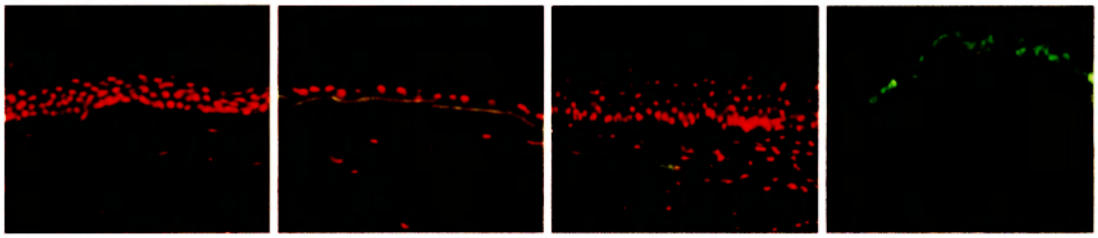
CK 5/6



CK 6

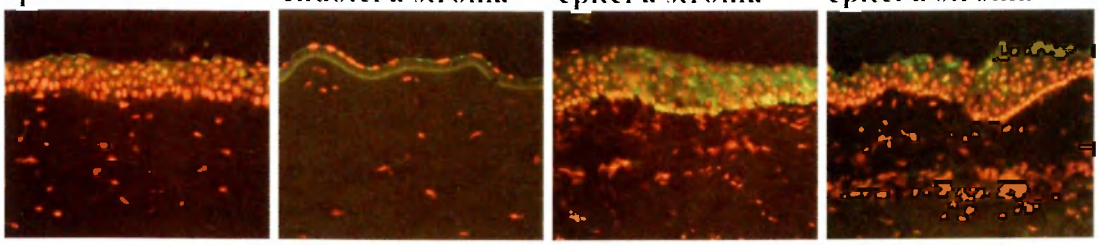


CK 7

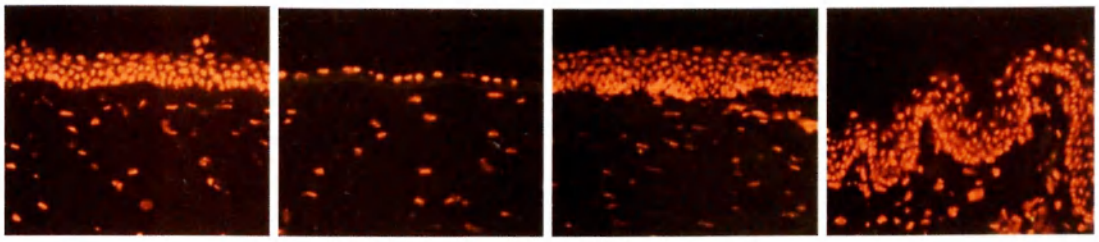


CK 8

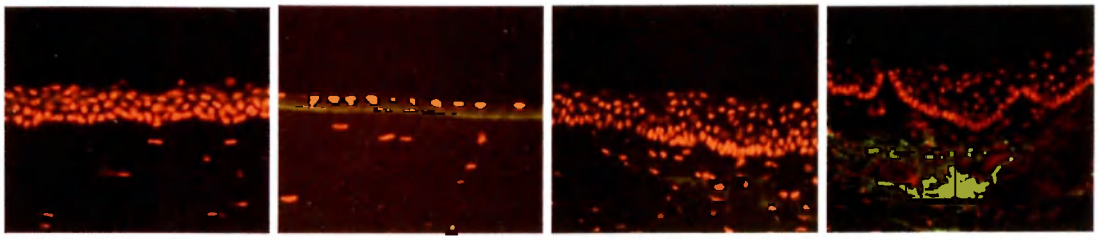
Rohovka: epitel a stroma	Rohovka: endotel a stroma	Limbus: epitel a stroma	Spojivka: epitel a stroma



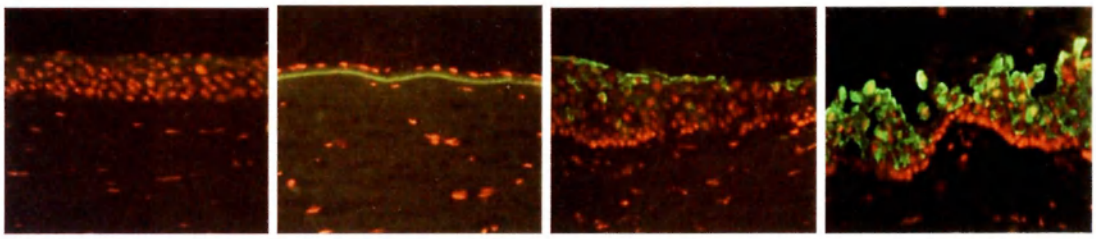
CK 9



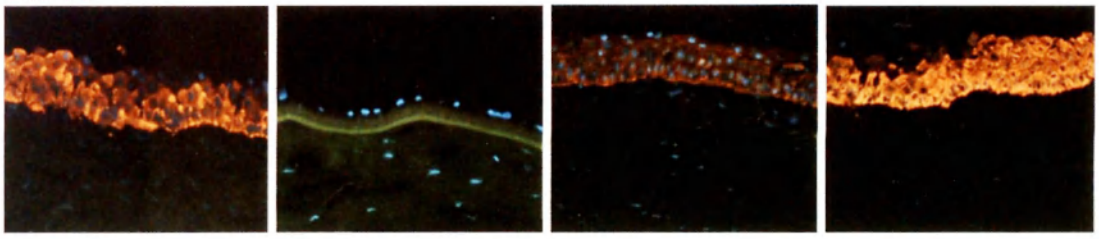
CK 10



CK 10/13

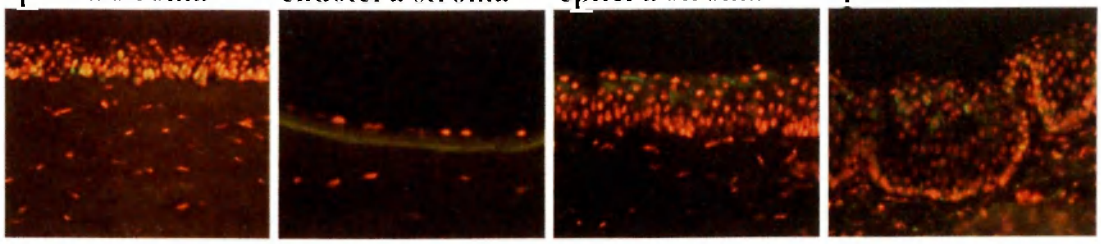


CK 14

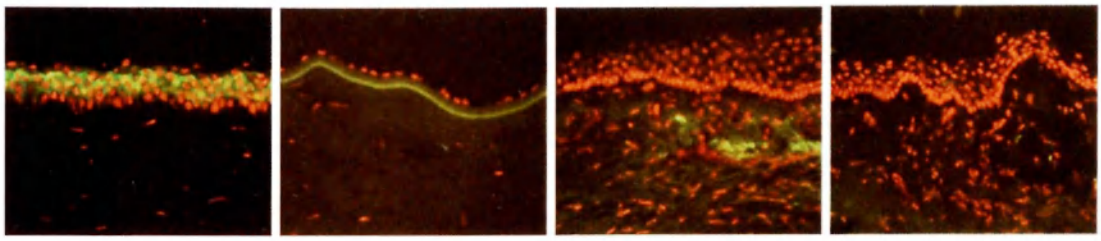


CK 15

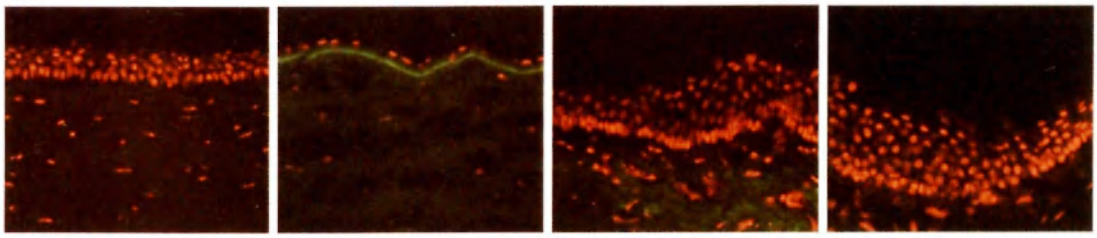
Rohovka: epitel a stroma	Rohovka: endotel a stroma	Limbus: epitel a stroma	Spojivka: epitel a stroma



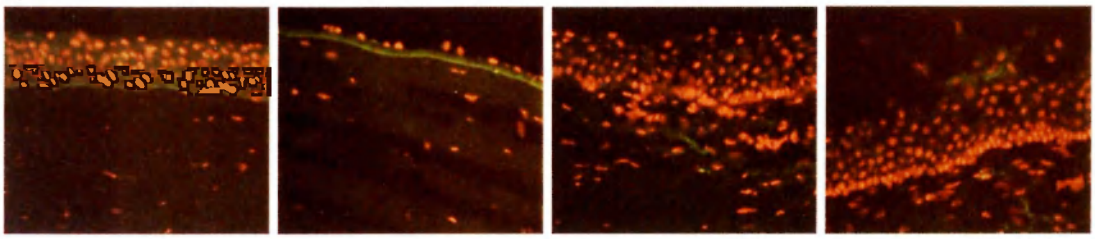
CK 16



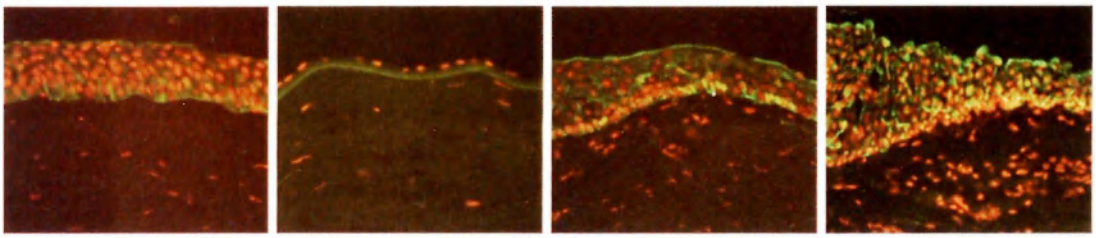
CK 17



CK 18

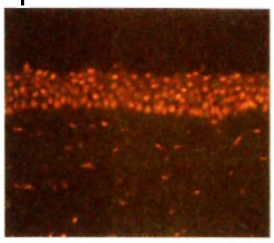


CK 19

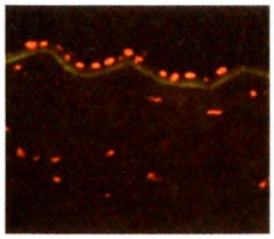


CK 20

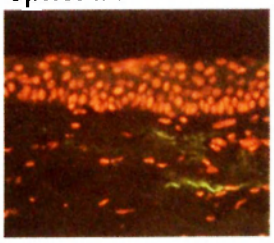
Rohovka:
epitel a stroma



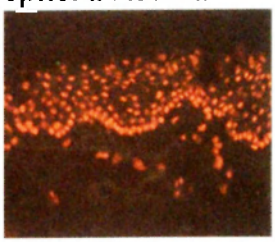
Rohovka:
endotel a stroma



Limbus:
epitel a stroma



Spojivka:
epitel a stroma



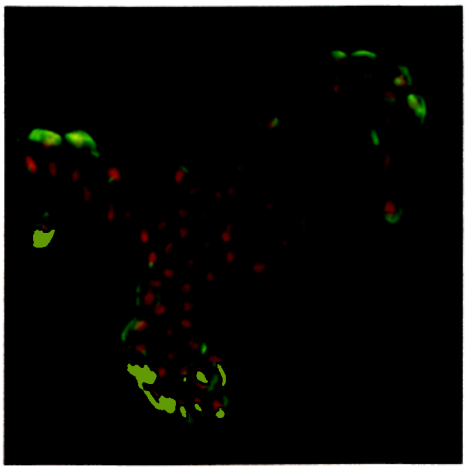
6.2. DETEKCE CYTOKERATINU 7 NA POVRCHU ZDRAVÉ ROHOVKY A SPOJIVKY A NA POVRCHU OKA PACIENTŮ S DLKB

Sledovali jsme na membránách Millicell přítomnost a procentuální zastoupení CK 7 pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemické analýzy na povrchu kontrolního epitelu spojivky v Tab. 11, (Obr. 10), kontrolním epitelu rohovky v Tab. 12, (Obr. 11) a na epitelu rohovek pacientů v Tab. 13, (Obr. 12).

Tab. 11: Procentuální zastoupení buněk s přítomností CK 7 na povrchu kontrolní horní bulbární spojivky (K - kontrolní vzorek, OP - oko levé, OL - oko levé, T - temporální kvadrant, N - nazální kvadrant), (intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná).

vzorky	**CK 7**
	% pozitivních buněk / intenzita signálu
K1 OP/T	100/2
K1 OL/T	92/2
K1 OP/N	95/2
K2 OP	93/1
K3 OP/T	80/1
K4 OP	95/2

Obr. 10: Přítomnost CK 7 v buňkách na povrchu kontrolní horní bulbární spojivky. Signál pro CK 7 je zelený (FITC), jádra jsou červená (PI), (zvětšení 400x).



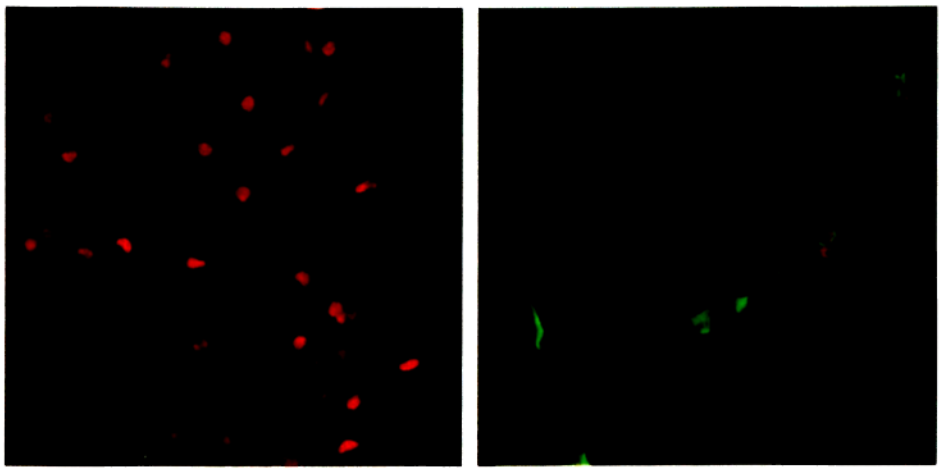
Epitel kontrolní spojivky exprimuje CK 7 průměrně v 93 % buněk. Signál je slabý až střední, (Obr. 10).

Tab. 12: Procentuální zastoupení buněk s přítomností CK 7 na povrchu kontrolního epitelu rohovky, (K – kontrolní vzorek, OP - oko levé, OL - oko levé, intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná.

vzorky	**CK 7**	
	% pozitivních buněk/ intenzita signálu	
	střed a pericentrální oblast rohovky	**periferie rohovky, limbus**
K1 OP	0/0	100/2
K1 OL 1	0/0	0/0
K1 OL 2	2/1	95/2
K2 OL	0/0	0/0

Obr. 11: Přítomnost CK 7 na povrchu kontrolního epitelu rohovky. Signál pro CK 7 je zelený (FITC), jádra jsou červená (PI), (zvětšení 400x).

střed rohovky **periferie rohovky / limbus**

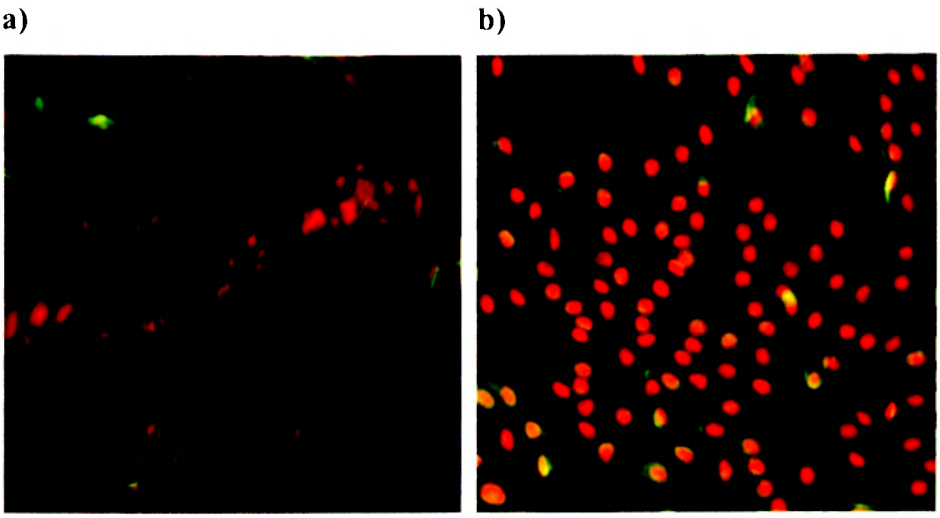


V kontrolních vzorcích rohovek byl CK 7 v centrální a pericentrální oblasti rohovky průměrně v 0,5 % buněk, na periferii rohovky a v limbální oblasti byl CK 7 pozitivní v 49 % buněk,(Obr. 11).

Tab. 13: Procentuální zastoupení buněk s přítomností CK 7 na povrchu epitelu rohovky pacientů (P1 – P5), (P – vzorek od pacienta, OP – oko pravé, OL – oko levé, intenzita signálu: 0 - negativita, 1 - slabá, 2 - střední, 3 - silná, 4 - velmi silná).

vzorky	**CK 7**
	% pozitivních buněk/ intenzita signálu
P1 OL	100/2
P2 OL	80/2
P3 OP	40/1
P4 OP	100/1
P5 OP	75/2

Obr. 12: Přítomnost CK 7 v buňkách na povrchu rohovky od pacientů: buňky epitelu spojivky přerůstající epitel rohovky, P2 – a), P1 – b). Signál pro CK 7 je zelený (FITC), jádra jsou červená (PI), (zvětšení 400x).



Na vzorcích povrchu epitelu rohovek od pacientů s DLKB se CK 7 vyskytoval přibližně v 79 % buněk. Detekovali jsme přerůstání spojivkového epitelu přes epitel rohovky, buňky spojivky migrují do oblasti rohovky v provazcích či síť vytvářejících útvarech, (Obr. 12a), často plně nahrazují epitel rohovky, (Obr. 12b).

7. DISKUZE

Cílem této studie bylo provedení detailní lokalizace cytokeratinů CK 1, CK 2e, CK 3/12, CK 4, CK 5/6, CK 6, CK 7, CK 8, CK 9, CK 10, CK 10/13, CK 14, CK 15, CK 16, CK 17, CK 18, CK 19 a CK 20 v jednotlivých vrstvách rohovky, limbu a spojivky. Poslední souhrnná studie o CK v oční tkáni (Kivela a Uusitalo, 1998) zahrnuje pouze CK: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19. Vzhledem k dostupnosti specifických protilátek v posledních několika letech i odlišnosti v metodách bylo třeba získané informace ověřit a aktualizovat.

V experimentech, ve kterých jsme detekovali přítomnost jednotlivých cytokeratinů v kontrolních vzorcích rohovky, limbu a spojivky pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie, jsme ověřili přítomnost pro rohovku typického CK 3/12, (Moll et al. 1992, Chen et al. 1994). Dále jsme ve všech vrstvách rohovky zjistili přítomnost CK 4, CK 5/6, CK 8, CK 10/13, CK 14, CK 16, CK 18, CK19. CK 4 a CK 5/6 jsou významnou složkou vrstevnatého squamózního epitelu, potvrdili jsme jejich výskyt ve všech vrstvách epitelu rohovky, (Pitz et al. 2002), zatímco Kasper et al. 1988 popisuje pouze ojedinělý výskyt CK 4 v rohovce, (Kivela et al. 1998). CK 5 byl popsán v bazální vrstvě epitelu rohovky, (Chen et al. 1994, Kivela et al. 1998) a CK 6 nebyl v epitelu rohovky prokázán, (Lauweryns et al. 1993). V našich experimentech se CK 6 nacházel ojediněle v povrchové a suprabazální vrstvě. CK 5 jsme detekovali ve všech vrstvách rohovky asi s 80 % výskytem. CK 14 jsme detekovali ve všech vrstvách epitelu rohovky především v bazální vrstvě. CK 14 je zodpovědný za mitotickou aktivitu proliferativních bazálních buněk vrstevnatého epitelu a vyskytuje se převážně v bazálních vrstvách vrstevnatého epitelu, (Yoshida et al. 2006). CK 10/13 jsme detekovali hlavně v povrchových vrstvách, což odpovídá popsanému výskytu CK 13, (Pitz et al. 2002, Lauweryns et al. 1993). CK 10 by se v normálním epitelu rohovky neměl vyskytovat, (Elder et al. 1997, Lauweryns et al. 1993). Přesto jsme detekovali CK 10 jako minoritní komponentu epitelu rohovky. Dále jsme detekovali CK 16 ve všech vrstvách epitelu rohovky s dominantním výskytem v povrchové a suprabazální vrstvě, narozdíl od jiných studií, kde je považován za minoritní komponentu, (Kasper et al, 1992, Elder et al. 1997). Dále jsme prokázali výskyt CK 8 a CK 18 v epitelu rohovky, jejichž výzkumy mají odlišné výsledky v závislosti na použité metodě, i když jejich přítomnost v lidské rohovce byla prokázána, (Kasper et al. 1992). Také jsme potvrdili výskyt CK 15 jako minoritní

složky cytoskeletu rohovkového epitelu, (Pitz et al. 2002), novější studie popisují úplnou absenci CK 15 v rohovkovém epitelu, (Yoshida, 2006). V našich experimentech jsme detekovali CK 19, v dříve provedených studiích však CK 19 v epitelu rohovky detekován nebyl, (Elder et al. 1997, Donisi et al. 2003), další studie ukazují, že CK 19 je negativní pouze v centru rohovky a v periferii je pozitivní ve všech vrstvách, (Lauweryns et al. 1993, Kivela et al. 1998, Yoshida et al, 2006). My jsme detekovali CK 19 ve všech vrstvách epitelu rohovky, jeho výskyt se směrem do centra rohovky snižuje, v centrální části rohovky přítomen nebyl. Jednoznačná informace o přítomnosti či nepřítomnosti CK 19 na povrchu rohovky je nezbytná pro diagnostiku DLKB. Epitel rohovky byl ve všech vrstvách negativní pro CK 1, CK 2e, CK 7, CK 9, CK 17 a CK 20. U CK 7 byl popsán možný minoritní výskyt v bazálních buňkách v centru rohovky, (Kasper et al. 1992). Jako možná minoritní komponenta cytoskeletu rohovky byl popsán i CK 17, (Kasper et al. 1992, Elder et al. 1997).

V limbu jsme detekovali CK 3/12, CK 5/6, CK 8, CK 10/13, CK 14, CK 15, CK 18 a CK 19 ve všech vrstvách epitelu. Potvrdili jsme přítomnost CK 3/12, který je charakteristický pro epitel rohovky, CK 3/12 jsme detekovali především v povrchové a suprabazální vrstvě. Novější studie popisuje výskyt CK 12 v bazální vrstvě epitelu, (Yoshida, 2006). Dále jsme potvrdili výskyt CK 19 a CK 4. CK 19 byl popsán v bazální a suprabazální vrstvě a CK 4 byl popsán v povrchových vrstvách epitelu limbu, (Lauweryns et al. 1993). My jsme CK 19 lokalizovali v celém epitelu limbu a CK 4 jsme detekovali v povrchových vrstvách. Dále jsme zjistili přítomnost CK 6, CK 7 a CK 10 jako minoritní komponenty povrchových vrstev, na rozdíl od jiných studií, kde jsou uváděny pro epitel limbu negativní, (Lauweryns et al. 1993). CK 8 a CK 18 jsou uváděny v epitelu limbu jako negativní, (Lauweryns et al. 1993). My jsme detekovali tyto CK ve všech vrstvách epitelu limbu. Detekovali jsme CK 10/13 hlavně v povrchových buňkách epitelu limbu, což odpovídá výskytu CK 13 v povrchových vrstvách limbu, (Lauweryns et al. 1993). CK 19 jsme detekovali ve všech vrstvách epitelu limbu, na rozdíl od studie, která jej detekuje jen v bazální a suprabazální vrstvě, (Yoshida, 2006).

Prokázali jsme výskyt CK 15 v bazální a suprabazální vrstvě v oblasti limbu, kde se nacházejí limbální kmenové buňky pro epitel rohovky. To, nás vede k úvaze, že by mohl být CK 15 pokládán za specifický márker limbálních kmenových buněk. Souběžně

s naším pozorováním popsal CK 15 v oblasti limbu Yoshida et al. (2006). CK 1, CK 2e, CK 9 a CK 20 byly negativní ve všech vrstvách epitelu limbu.

Ve všech vrstvách spojivkového epitelu jsme prokázali expresi CK 3/12, CK 4, CK 5/6, CK 7, CK 8, CK 10/13, CK 14, CK 15, CK 18 a CK 19. Potvrdili jsme tak dominantně se vyskytující CK 4, CK 5, CK 13, CK 14, CK 15 a CK 19 v epitelu spojivky, dále jsme potvrdili ojedinělý výskyt CK 6 a 16, (Kasper et al. 1992, Kurpakus et al. 1994). Přítomnost CK 3/12 v epitelu spojivky je kontroverzní, Elder et al. 1997 popsali výskyt CK 3 v bazálním epitelu spojivky, Chen et al. 1994 nebyl schopen detekovat CK 12 ve spojivce a další Wei et al. 1993 popisují přítomnost obou CK jen ve velmi malém množství, (Pitz et al. 2002). My jsme zjistili výskyt CK 3/12 v povrchové a suprabazální vrstvě (30 %), v bazální pouze 8 % pozitivitu buněk epitelu spojivky. CK 4 a CK 13 se vyskytují převážně v superficiální vrstvě, (Kivela et al. 1998), my jsme tyto CK navíc detekovali v suprabazální vrstvě, minoritně i v bazální vrstvě. U CK 5, CK 14 a CK 15, které jsou typické pro bazální vrstvu spojivky, jsme navíc zjistili výskyt CK 14 a CK 15 i v suprabazální a povrchové vrstvě, (Yen et al. 1992). Při detekci CK 5/6, jsme zjistili jeho výskyt ve všech vrstvách spojivky s dominantním zastoupením v povrchové vrstvě, přičemž námi detekovaný CK 6 byl přítomen v povrchových vrstvách, ale jen minoritně. Přítomnost CK 17 v epitelu spojivky jsme neprokázali, i když je popisován jako možná minoritní komponenta epitelu spojivky, (Kaper et al. 1992, Kurpakus et al. 1997). Potvrdili jsme minoritní výskyt CK 18, (Kaper et al. 1992). Výskyt CK 19 byl popsán ve všech vrstvách rohovky, (Kivela et al. 1998, Elder et al. 1997, Donisi et al. 2003). Stejnou lokalizaci jsme popsali i v našich experimentech. CK 1, CK 2 a CK 10 jsou typickým rohovatějícím epitelem a v epitelu spojivky nebyly prokázány, (Krenzer et al. 1997), ani my jsme jejich přítomnost v epitelu spojivky také neprokázali. V epitelu spojivky jsme neprokázali CK 2e, CK 9, CK 16, CK 17 a CK 20.

CK 7 je charakteristický pro žlazový epitel, (Ramaekers et al. 1987), v epitelu spojivky je jeho exprese charakteristická pro pohárkové buňky, (Krenzer et al. 1997). My jsme zjistili přítomnost CK 7 i ve všech vrstvách epitelu spojivky s dominantním výskytem v povrchové vrstvě.

V endotelu jsme detekovali přítomnost CK 8 a CK 18. Výsledky studií o jejich výskytu v endotelu rohovky jsou dosud sporná. Zatímco někteří autoři přítomnost těchto

CK v endotelu potvrdili (Jirsová et al. 2006, Kasper et al. 1992), jiným se jejich přítomnost v endotelu zdravé rohovky nepodařilo prokázat, (Kramer et al. 1992, Levy et al. 1995).

Znalost výskytu CK v těchto tkáních nejen přispívá k rozšíření znalostí stavu v normální tkáni, ale následně umožňuje i srovnání odchylek, ke kterým dochází za patologických stavů.

Naše výsledky ukazují, že některé CK jsou přítomny v buňkách na povrchu rohovky (CK 16) a zároveň se nevyskytují na spojivce. Na druhé straně jsou CK 7 a CK 15, které jsou přítomny v buňkách na povrchu spojivky, ale na povrchu rohovky lokalizovány nebyly. Tyto rozdíly v povrchu rohovky a spojivky by se mohly využít v diagnostice DLKB. Laboratorní diagnostika DLKB dosud vycházela z práce založené na rozdílném výskytu CK 3 specifického pro epitel rohovky a CK 19 typického pro epitel spojivky, (Donisi et al. 2003, Elder et al. 1997).

Nám se jako nadějné pro možnou diagnostiku DLKB jevily CK 7 a CK 16. Pro lepší rozlišení jednotlivých epitelů je vhodnější CK 7, který je pozitivní na spojivce a negativní na rohovce; lze totiž lépe rozeznat přerůstání pozitivních buněk spojivky přes negativní epitel rohovky. Použití CK 16, který je negativní v epitelu spojivky a pozitivní v epitelu rohovky je třeba také zvážit.

Vzhledem k poměrně malému počtu vzorků získaných od pacientů s DLKB jsme začali s ověřováním CK 7 jako možného specifického márkru přerůstání spojivkového epitelu přes rohovkový během deficience limbálních kmenových buněk.

V průběhu experimentu detekujícího přítomnost CK 7 ve zdravé rohovce a spojivce pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie na membránách Millicell jsme pozorovali, že CK 7 je v epitelu zdravé rohovky negativní, zatímco v epitelu spojivky je CK 7 pozitivní přibližně v 96 %. Na vzorcích od pacientů s DLKB byl CK 7 na povrchu rohovky přítomen přibližně v 80 %. Z uvedených výsledků vyplývá, že CK 7 by mohl být CK, jehož detekce na povrchu rohovky by mohla zpřesnit diagnostiku DLKB.

8. ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat výskyt jednotlivých cytokeratinů v lidské rohovce, limbu a spojivce na kontrolních vzorcích zdravých jedinců. Zjistili jsme, že v epitelu zdravé rohovky se vyskytuje pro rohovku specifický CK 3/12. Dále jsme detekovali cytokeratiny charakteristické pro jednoduchý (CK 8, CK 18, CK 19), ale i vrstevnatý (CK 4, CK 5, CK 13, CK 14) epitel, i pro epitel s hyperproliferační kapacitou (CK 16). V rohovce nebyly detekovány CK 2e, CK 7, CK 9, CK 17 a CK 20.

V epitelu limbu jsme detekovali CK 3/12 a zjistili jsme pozitivitu pro jednoduchý (CK 8, CK 18, CK 19) i vrstevnatý (CK 4, CK 5, CK 13, CK 14, CK 15) epitel. CK 1, CK 2e, CK 9 a CK 20 byly v epitelu limbu negativní.

Ve spojivkovém epitelu jsme prokázali přítomnost CK 3/12 a expresi charakteristickou pro jednoduchý (CK 7, CK 8, CK 18, CK 19), vrstevnatý (CK 4, CK 5, CK 13, CK 14, CK 15) epitel. Ve spojivce jsme nedetekovali CK 1, CK 2e, CK 9, CK 10, CK 17 a CK 20.

Důležitým výsledkem je zjištění lokalizace jednotlivých cytokeratinů na povrchu epitelu rohovky a spojivky. Na povrchu rohovky se vyskytuje CK 16, jenž se nevyskytuje na povrchu spojivky. Ve spojivce jsme lokalizovali CK 7, který není přítomný na povrchu rohovky. Dále jsme charakterizovali CK 15 jako možný márker limbálních a z nich diferencovaných buněk. Potvrdili jsme výskyt CK 8 a 18 v endotelu zdravé rohovky.

CK 7 byl úspěšně testován jako možný márker přerůstání rohovkového epitelu přes epitel rohovky.

9. LITERATURA

• Beranová, M., Tonar, Z. (2002): Principy a příklady imunohistochemie. Grant FRVŠ F3 2082: Zavedení imunohistochemických metod do praktických cvičení z histologie. Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Plzni, 1-32.

• Calonge, M., Diebold, Y., Sáez, V., Enríquez de Salamanca, A., García-Vázquez, C., Correles, R.M., Herreras, J.M. (2003): Impression cytology of the ocular surface: a review. Experimental Eye Research 78: 457-472.

• Corden, L.D., Swensson, O., Swensson, B., Smith, F.J.D., Rochels, R., Uitto, J., McLean, W.H.I. (2000): Molecular genetics of Meesmann's corneal dystrophy: ancestral and novel mutations in keratin 12 (K12) and complete sequence of the human KRT12 gene. Experimental Eye Research 70: 41-49.

• Daniels, J.T., Dart, J.K.G., Tuft, S.J., Khaw, P.T. (2001): Corneal stem cells in review. Wound Repair and Regeneration 9: 483-494.

• Donisi, P.M., Rama, P., Fasolo, A., Ponzin, D. (2003): Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. Cornea 22: 533–538.

• Dua, H.S., Saini, J.S., Azuara – Blanco, A., Gupta, P. (2000): Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. Indian Journal of Ophthalmology 48: 83–92.

• Dua, H.S., Azuara – Blanco, A. (1999): Amniotic membrane transplantation. Br. J. Ophtalmol. 83: 748–752.

• Dua, H.S., Kulkarni, B., Franzo, R.S. (2006): Quest for limbal stem cells. Clinical and Experimental Ophtalmology 34: 1-2.

• 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.

• Holly, F.J., Lemp, M.A. (1977): Tear physiology and dry eyes. Survey Ophthal. 22: 69–87.

• Hidayat, A., Cockerham, G. (2006): Epithelial metaplasia of the corneal endothelium in Fuchs endothelial dystrophy. Cornea 25: 956-959.

• Foest, B.J., Van den Oord, J.J., Desmet, V.J., Misoten, L. (1990): Cytoskeletal filament typing of human corneal endothelial cells. Cornea 9: 312-317.

- Gipson, I.K., Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. In: Smolin, G., Thoft, R.A. (eds): The Cornea (3rd edition), 1994, Little, Brown and Company, 3-24.
- Chen, M., Doostan, A., Bandyopadhyay, P., Remington, J., Wang, X., Hou, Y., Liu, Z., Woodley, D.T. (2007): The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for Epidermolysis bullosa acquisita. Am. J. Pathol. 170: 2009–2018.
- Chen, W.Y.W., Mui, M.M., Kao, W.W.Y., Liu, Ch.Y., Tseng, S.C.G. (1994): Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. Current Eye Research 13: 765-778.
- Chu, Y.W., Seftor, E.A., Romer, L.H., Hendrix, M.J.C. (1996): Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. American Journal of Pathology 148: 63–69.
- Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J.A., Judge, M.R., Leigh, I.M., Lane, E.B., Eady, R.A. (1992): Selective involvement of keratins K1 and K10 in the cytoskeletal abnormality of epidermolytic hyperkeratosis (bullous congenital ichtyosiform erythroderma). J. Invest. Dermatol. 99: 19-26.
- Irvine, A.D., Corden, L.D., Swensson, O., Moore, J.E., Frazer, D.G., Smith, F.J., Knowlton, R.G., Christophers, E., Rochels, R., Uitto, J., McLean, W.H. (1997): Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. Nature genetics 16: 7-184.
- Jirsová, K., Merjavá, S., Martincová, R., Gwilliam, R., Ebenezer, N.D., Liskova, P., Filipec, M. (2007): Immunohistochemical characterization of cytokeratin in the abnormal corneal endotelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients. Experimental Eye Research 84: 680-686.
- Jonkman, M.F., Heeres, K., Hendri, H.P., Van Luyn, M.J.A., Elema, J.D., Corden, L.D., Smith, F.J.D., McLean, W.H., Ramaekers, F.C.S., Burton, M., Scheffer, H. (1996): Effects of keratin 14 ablation on the clinical and cellular phenotype in a kinder with recesive epidermolysis bullosa simplex. J. Invest. Dermatol. 107: 764–769.
- Karpakus, M.A., Miniaci, M.T., Esco, M. (1994): Expression of keratins K12, K4, and K14 during development of ocular surface epithelium. Curr. Eye Res. 13: 805-814.

- Kasper, M., Moll, R., Stosiek, P., Karsten, U. (1988): Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. Histochemistry 89: 369-377.
- Kasper, M., Stosiek, P., Lane, B. (1992): Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. Acta Histochemica 93: 371–381.
- Kenyon, K.R., Tseng, S.C. (1989): Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology 96: 709-723.
- Kimonis, V., DiGiovanna, J.J., Yang, J.M., Doyle, S.Z., Bale, S.J., Compton, J.G. (1994): A mutation in the V1 end domain of keratin 1 in non-epidermolytic palmar-plantar keratoderma. J. Invest. Derm. 103: 764-769.
- Kivela, T., Uusitalo, M. (1998): Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neural cells of human eye. Progress in Retinal and Eye Research 17: 385-428.
- Kozák, I., Trbolová, A., Ševčíková, Z., Ledecký, V., Juhás, T. (2001): Histopatologický obraz po chemickom poranení oka, úloha limbálnych kmeňových buniek. Čes. a slov. oftal. 57: 104-108.
- Kraus, H. a kol.: Kompendium očního lékařství (1.vydání), 1997, Grada Publishing, Praha, 1-360.
- Krenzer, K.L., Freddo, T.F. (1997): Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38: 142–152.
- Kurpakus, M.A., Maniaci, M.T., Esco, M. (1994): Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. Curr. Eye Res. 13: 805–814.
- Lavker, R.M., Tseng, S.C.G., Tung-Tein., S. (2003): Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. Experimental Eye Research 78: 433-446.
- Lauweryns, B., Van den Oord, J.J., De Vost, R., Missotten, L. (1993): A new epithelial cell type in the human cornea. Investigave Ophthalmology Visual Science 34: 1983–1993.
- McKelvie, P. (2003): Ocular surface impression cytology. Adv. Anat. Pathol. 10: 328-337.

- McLean, W.H.I., Morley, S.M., Lane, E.B., Eady, R.A., Griffiths, W.A., Paige, D.G., Harper, J.I., Higgin, C., Leigh, I.M. (1994): Ichtyosis bullosa of Siemens: a disease involving keratin 2e. J. Invest. Dermatol. 103: 81-277.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R. (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11-24.
- Moraru, R., Cserhalmi-Friedman, P.B., Grossman, M.E., Schneiderman, P., Christiano, A.M. (1999): Ichthyosis bullosa of Siemens resulting from a novel missense mutation near the helix termination motif of the keratin 2e gene. Clinical and Experimental Dermatology 24: 412-415.
- Nečas, O. a kol.: Cytoskelet (1.vydání), 1991, Academia, Praha, 1-252.
- Nelson, J.D. (1988): Impression cytology. Cornea 7: 71–81.
- Nishida T.: Cornea, In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. (eds): Cornea (2nd edition), 2005, Elsevier MOSBY Inc., 3-26.
- Oshima, R.G., Baribualt, H., Caulín, C. (1996): Oncogenetic regulation and function of keratin 8 and 18. Cancer and Metastasis Review 15: 445–471.
- Pitz, S., Moll, R. (2002): Intermediate-filament expression in ocular tissue. Progress in Retinal and Eye Research 21: 241-262.
- Papanicolaou, G.N. (1942): A new procedure for staining vaginal smears. Science 95: 438–439.
- Ramaekers, F., Huysmans, A., Schaart, G., Vooijs, P. (1987): Tissue distribution of keratin 7 as monitored by a monoclonal antibody. Exp. Cell Res. 170: 235-249.
- Ryynanen, M., Knowlton, R.G., Uitto, J. (1991): Mapping of Epidermolysis bullosa simplex mutation to chromosome 12. Am. J. Hum. Genet. 49: 978-984.
- Sadowsky, A.E., Dermatologic disorders. In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. (eds): Cornea (2nd edition), 2005, Elsevier MOSBY Inc., 841-853.
- Smith, F.J.D. (2003): The molecular genetics of keratin disorders. Am. J. Clin. Dermatol. 4: 347-364.
- Sridhar, M.S., Vemuganti, G.K., Bansal, A.K. (2001): Ipression cytology – proven corneal stem cell deficiency in patients after surgies involving the limbus. Cornea 20: 145–148.

- Upasani, S.O., Vaidya, M.M., Bhisey, A.N. (2004): Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. Oral oncology 40: 236-256.
- Van der Velden, L.A., Manni, J.J., Ramaekers, F.C.S., Kuijpers, W. (1999): Expression of intermediate filament proteins in benign lession of the oral mucosa. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 256: 514–519.
- Waring, G.O., Bourne, W.M., Elderhauser, H.F., Kenyon, K.R. (1982): The corneal endothelium, normal and pathologic structure and function. Ophthalmology 89: 531-590.
- Yoshida, S., Shimmura, S., Kawakita, T., Miyashita, H., Den, S., Shimazaki, J., Tsubota, K. (2006): Cytokeratin 15 can be used to identity the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. Investigative Ophthalmology Visual Science 47: 4780-4786.

Poděkování

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