

Univerzita Karlova, Praha

2.lékařská fakulta

Ústav fyziologie



Oxidační poškození rohovky a čočky

MUDr. Gabriela Mahelková

2009

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří svou pomocí, radou a podporou umožnili, aby tato práce vznikla:

Své školitelce, doc. RNDr. Janě Novotné, CSc., která mě vedla během mého postgraduálního studia, objasnila mi základy biochemie kolagenních proteinů a extracelulární matrix a naučila základní metodické přístupy.

Prof. MUDr. Janu Hergetovi, DrSc. za jeho dlouhodobou podporu, cenné rady a trpělivost.

RNDr. Richardu Vytáškovi, Ph.D., který mě ochotně pomáhal při zavádění metodiky kultivace buněk epitelu čočky v naší laboratoři, připravil monoklonální protilátky proti 3-nitrotyrosinu a prováděl jeho měření, připravil monoklonální protilátky proti proteinům čočky (α -, β - a γ -krystalinům) a zavedl metodiku a prováděl následně i měření počtu buněk pomocí fluorescence v pokusech testujících vliv oxidantů a antioxidantů na proliferaci buněk epitelu čočky.

MUDr. Lucii Bačákové, CSc., která mě učila základům kultivace buněk in vitro a v případě potřeby mi vždy ochotně poradila.

Prof. RNDr. Jiřímu Wilhelmovi, Ph.D., který mi objasnil základy chemie kyslíkových radikálů, umožnil nám využít metodu sledování radikálového poškození pomocí lipofuscinoïdních pigmentů zavedenou v jeho laboratoři a inicioval a podílel se na provádění pokusů testujících vliv oxidantů a antioxidantů na proliferaci buněk epitelu čočky.

MUDr. Aleně Moravové, která prováděla hodnocení radikálového poškození tkáně rohovky pomocí měření koncentrace lipofuscinoïdních pigmentů.

Doc. MVDr. Ludku Vajnerovi, CSc. a jeho spolupracovníkům z Ústavu histologie UK 2.LF, kteří mi pomáhali při zavádění metodiky imunohistochemického barvení tkáňových kultur.

Děkuji také všem ostatním spolupracovníkům za pomoc a vstřícnost, své rodině za trpělivost a podporu a doc. MUDr. Jiřímu Koryntovi, CSc. za to, že mě k této práci přivedl.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 7 |
| 1.1 Role reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku v organismu | 7 |
| 1.1.1 Role volných radikálů při remodelaci tkáně v hypoxii | 9 |
| 1.1.2 Mechanismus účinku H₂O₂ a antioxidantů na proliferaci buněk | 10 |
| 1.2 Rohovka | 12 |
| 1.2.1 Stavba a základní vlastnosti | 12 |
| 1.2.2 Rohovka v podmínkách hypoxie | 14 |
| 1.2.3 Význam matrixových metaloproteinů v rohovce | 16 |
| 1.3 Čočka | 17 |
| 1.3.1 Stavba a základní vlastnosti | 17 |
| 1.3.2 Katarakta | 19 |
| 1.3.3 Sekundární katarakta, studium buněk čočkového epitelu | 20 |
| 2 Hypotézy a cíle práce | 24 |
| 2.1 Vliv hypoxie na změny extracelulární matrix rohovky | 24 |
| 2.2 Vliv kultivačního podkladu na proliferaci buněk čočkového epitelu a expresi α-SMA | 24 |
| 2.3 Oxidanty a antioxidanty jako faktory regulující proliferaci buněk epitelu čočky | 25 |
| 3 Vlastní experimentální práce | 26 |
| 3.1 Vliv hypoxie na změny extracelulární matrix rohovky | 26 |
| 3.1.1 Materiál a metody | 26 |
| 3.1.1.1 Expozice hypoxii | 26 |
| 3.1.1.2 Stanovení vaskularizace rohovky | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.1.3 Zpracování rohovkové tkáně | 26 |
| 3.1.1.4 Analýza kolagenních proteinů v rohovce | 27 |
| 3.1.1.5 Zymografie | 28 |
| 3.1.1.6 Stanovení 3-nitrotyrosinu metodou ELISA | 28 |
| 3.1.1.7 Měření poškození proteinů volnými radikály | 29 |
| 3.1.1.8 Chemikálie | 30 |
| 3.1.1.9 Statistická analýza | 30 |
| 3.1.2 Výsledky | 30 |
| 3.1.2.1 Váha pokusných zvířat | 30 |
| 3.1.2.2 Vaskularizace rohovek | 31 |
| 3.1.2.3 Analýza kolagenních proteinů v rohovce | 31 |
| 3.1.2.4 Zymografická analýza | 31 |
| 3.1.2.5 Stanovení radikálového poškození tkáně rohovky | 31 |
| 3.1.3 Diskuze | 32 |
| 3.2 Vliv kultivačního podkladu na proliferaci buněk čočkového epitelu a expresi α-SMA | 35 |
| 3.2.1. Materiál a metody | 35 |
| 3.2.1.1 Izolace buněk čočkového epitelu a primární kultura | 35 |
| 3.2.1.2 Kultivace sekundární kultury | 36 |
| 3.2.1.3 Imunocytochemická analýza a analýza proliferace buněk | 37 |
| 3.2.1.4 Příprava antigenů krystalinů prasečí čočky | 38 |
| 3.2.1.5 Příprava monoklonálních protilátek | 38 |
| 3.2.1.6 Testování produkce α -, β - a γ -krystalinů buňkami epitelu čočky | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.1.7 Vliv režimu výměny kultivačního media | 39 |
| 3.2.1.8 Statistická analýza | 40 |
| 3.2.2 Výsledky | 41 |
| 3.2.2.1 Chování buněk v primární kultuře | 41 |
| 3.2.2.2 Chování buněk v sekundární kultuře 1.-4. den | 41 |
| 3.2.2.3 Chování buněk v sekundární kultuře 4.-8. den | 43 |
| 3.2.2.4 Vliv režimu výměny kultivačního media na proliferaci buněk | 44 |
| 3.2.3 Diskuze | 45 |
| 3.3 Oxidanty a antioxidanty jako faktory regulující proliferaci buněk epitelu čočky | 50 |
| 3.3.1 Materiál a metody | 50 |
| 3.3.1.1 Buněčná kultura | 50 |
| 3.3.1.2 Počítání buněk | 51 |
| 3.3.1.3 Statistická analýza | 51 |
| 3.3.2 Výsledky | 51 |
| 3.3.2.1 Efekt H ₂ O ₂ na proliferaci buněk | 51 |
| 3.3.2.2 Efekt α-tokoferolu na proliferaci buněk | 52 |
| 3.3.2.3 Efekt retinolu na proliferaci buněk | 53 |
| 3.3.3 Diskuze | 53 |
| 4 Souhrnné závěry | 56 |
| 5 Literatura | 58 |
| 6 Zkratky | 72 |
| 7 Obrázky | |
| 8 Přílohy | |

1 Úvod

1.1 Role reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku v organismu

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species RNS). Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Mají schopnost pohotově reagovat s biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a nukleovými kyselinami, nízkomolekulárními metabolity, koenzymy a dalšími. Mohou tak být prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany i signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však mohou působit i jako látky toxické a mohou organismus poškodit. Volné radikály jsou obecným metabolitem v každé buňce a každá buňka musí být vybavena prostředky, které jí před těmito reaktivními látkami chrání (Štípek, 2000a).

Předpokládá se, že ROS hrají významnou úlohu při vzniku mnoha patologických procesů v nitroočních tkáních. V rohovce mohou ROS aktivovat proces odbourávání složek extracelulární matrix a aktivovat přestavbu rohovkové tkáně, která může vést ke změně jejich fyziologických vlastností (Čejková, 2004). Významnou roli hrají ROS rovněž v procesu vzniku senilní katarakty (Whikehart, 2003; Forrester, 2002a).

| REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU | |
|-----------------------------------|---|
| Volné radikály | Látky, kterými nejsou volnými radikály |
| superoxid, $O_2^{\cdot -}$ | peroxid vodíku, H_2O_2 |
| hydroxylový radikál, HO^{\cdot} | kyselina chlorná, $HOCl$ |
| peroxyl, ROO^{\cdot} | ozon, O_3 |
| alkoxyl, RO^{\cdot} | singletový kyslík, 1O_2 |
| hydroperoxyl, HO_2^{\cdot} | |
| REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU | |
| oxid dusnatý, NO^{\cdot} | nitrosyl, NO^+ |
| oxid dusičitý, NO_2^{\cdot} | nitroxid, NO |
| | kyselina dusitá, HNO_2 |
| | oxid dusitý, N_2O_3 |
| | oxid dusičitý, N_2O_4 |
| | nitronium, NO_2^+ |
| | peroxynitrit, $ONOO$ |
| | alkylperoxynitrit, $ROONO$ |

Převzato z Štípek a kol. (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*,

Grada Publishing, Praha, str.32

1.1.1 Role volných radikálů při remodelaci tkáně v hypoxii

Volné radikály hrají významnou úlohu při dějích probíhajících ve tkáních při hypoxii. Hypoxie působí tkáňové poškození, jehož důsledkem je změna biochemických vlastností a následně i struktury mezibuněčné pojivové matrix. Jedním z možných mechanismů změn mezibuněčné matrix je působení uvolněných radikálů (NO, reaktivní sloučeniny kyslíku, ROS a produkty vznikající interakcí NO a ROS) (Cadenas, 1977; Misra, 1972; Fried, 1973; Herget, 2000, Hampl, 2000). Významným cílem volných radikálů jsou proteiny. Některé ROS a RNS mohou bezprostředně oxidovat aminokyselinové zbytky. S membránovými proteiny a s proteiny lipoproteinových částic (LDL, VLDL) reagují kromě jednoduchých ROS a RNS též alkoxylové a peroxylové radikály lipidů (LO•, LOO•) vznikající při lipoperoxidaci (LPO)(Štípek, 2000b) (Obr.1). Pro dokumentaci radikálového poškození tkáně může být použito stanovení proteinů modifikovaných produkty volných radikálů pomocí fluoreskujících proteinových adduktů (Gardner 1979, Fukuzawa 1985, Wilhelm a Herget 1999, Itakura 2000). Reakcí NO se superoxidem vzniká velmi reaktivní sloučenina peroxynitrit a další radikálové produkty (Štípek, 2000b; Muijsers, 1997)(Obr. 2). Nitrace tyrosinu v proteinech na nitrotyrosin může být použita jako marker tvorby peroxynitritu (Beckman and Koppelman, 1996; Beckman, 1996). Bylo popsáno, že chronická hypoxie zvyšuje kolagenolytickou aktivitu v periferních plicních cévách, což má za následek vznik nízkomolekulárních štěpů kolagenu typu I (Novotna, 1998; Novotna, 2001). Zásadní roli v procesu přestavby extracelulární matrix hrají enzymy označované jako matrixové metaloproteinasy (MMP's). Předpokládá se, že MMP's mohou být kromě klasické proteolytické cesty aktivovány také neproteolyticky látkami reagujícími s SH skupinami, detergenty nebo

ROS, NO, superoxid a také peroxynitrit jsou potentní aktivátory metaloproteinů intersticiální substance (Rajagopalan, 1996, Novotná 2002) (Obr. 3).

1.1.2 Mechanismus účinku H₂O₂ a antioxidantů na proliferaci buněk

ROS a RNS mohou za určitých okolností působit i jako růstové faktory. Jedním z mechanismů účinku peroxidu vodíku jako signální molekuly může být fosforylace tyrosinu v receptorech pro růstové faktory (Cantoni, 1996; Gamou, 1995, Morel 1999). Mezi signalizační cesty, které mohou být ovlivňovány H₂O₂ patří mitogeny aktivované proteinkinasové kaskády (MAPK) (Dröge, 2002). Protein kinasa C (PKC), serin/threonin kinasa, je zapojena do převodu signálu v různých cestách, které regulují transkripci a kontrolu buněčného cyklu. Ukázalo se, že dva ze známých transkripčních faktorů, NF-κB (nuclear factor κB) a faktor AP-1 (activator protein 1) mění svou aktivitu působením ROS. H₂O₂ může aktivovat transkripční faktor NF-κB a AP-1 pomocí aktivace PKC (Štípek, 2000b; Konishi, 1997) (Obr. 4). Bylo prokázáno, že PKC je zpočátku aktivována mírnou H₂O₂ oxidací, ale následně další oxidací inaktivována (Gopalakrishna, 1989).

V souvislosti s možným ovlivněním účinku ROS je široce diskutována úloha antioxidantů, mezi které patří retinol a alfa-tokoferol. Sloučeniny z rodiny PKC váží retinoidy s nanomolární afinitou. Vazebné místo bylo lokalizováno do domény bohaté na cystein, která tvoří zinkové prsty („zinc fingers“). Samy o sobě nejsou schopny retinoidy PKC aktivovat, ale v kombinaci s ROS je aktivace PKC signifikantně zvýšena. Předpokládá se, že hydroxylované retinoidy vazbou na zinkové prsty umožní oxidaci cysteinových zbytků. Tyto zinkové prsty mohou fungovat jako reverzibilní redox přepínače, protože jejich redukce vede k inaktivaci PKC (Imam,

2001). Retinol akceleruje oxidaci zinkových prstů pomocí ROS, jejich rozvolnění a uvolnění zinku, což vede k změně konformace. Obdobě probíhá aktivace c-raf. C-Raf protoonkogen je zásadní pro růst buněk, diferenciaci a přežití. Jeho hlavním efektem je MAPK. ROS vedou k aktivaci c-Raf/MAPK signální cesty. Peroxidem ovlivněná aktivace c-raf a PKC je usnadněna navázaným retinolem (Hoyos, 2005).

Oproti tomu vitamin E, alfa-tokoferol inhibuje PKC. D-alfa-tokoferol inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk v koncentraci 10-50 $\mu\text{mol/L}$. Prvním účinkem alfa-tokoferolu je aktivace transkripčního faktoru AP-1. Následuje aktivace či exprese proteinové fosfatasy, která defosforyluje PKC. To vede k inhibici PKC a tím k inhibici buněčné proliferace. D-beta-tokoferol je schopný inhibovat efekt D-alfa-tokoferolu vazbou na jeho vazebné místo (Azzi, 1995). V buněčné kultuře inhibice proliferace D-alfa-tokoferolem nebyla konstantní, ale v čase klesala. Konstantní inhibice byla zajištěna opakovaným přidáním D-alfa-tokoferolu každé 2 dny. To naznačuje, že D-alfa-tokoferol je spotřebováván buňkami (Boscoboinik, 1995; Ricciarelli, 1998). Inhibice buněčné proliferace D-alfa-tokoferolem je specifická dle typu buněk a závislá na mitogenu odpovědném za stimulaci růstu (Azzi, 1993). Z uvedeného vyplývá, že H_2O_2 , vitamin A a vitamin E mohou být významnými regulátory buněčné proliferace. V závislosti na dávce a podmínkách kultivace byla pozorována jak inhibice tak stimulace buněčné proliferace vlivem těchto faktorů.

V poslední době se do popředí zájmu jako růstový faktor dostává i oxid dusnatý. Dle podmínek a typu buněk může indukovat buněčnou smrt nebo působit jako faktor přežití (Kim, 1999; Taylor, 2003).

1.2 Rohovka

1.2.1 Stavba a základní vlastnosti

Rohovka je specializovaná transparentní tkáň, která je zároveň hlavní refrakční částí optického systému oka. Její schopnost propouštět světlo je dána přesnou organizací složek extracelulární matrix.

Rohovka se skládá ze 3 základních vrstev - epitel, stroma, endotel. Epitel je tvořen více (6) vrstvami postupně se oplošťujících buněk a je oddělen od následující vrstvy, stromatu, basální membránou. Třetí, vnitřní vrstvu představuje endotel, tvořený jednou vrstvou buněk. Je připojen ke stromatu specializovanou basální membránou označovanou jako Descemetová membrána. Rohovka neobsahuje cévy a její zásobení kyslíkem se děje převážně přímou difuzí z povrchu rohovky a částečně z přední komory a limbálních cév. Za fyziologických okolností rovněž neobsahuje složky imunitního systému (Fini, 1992; Fini, 1998; Fini, 1999; Forrester, 2002a; Stamler, 1998) (Obr. 5).

Rohovka obsahuje několik typů kolagenu. Na hranici mezi epitelem a stromatem a stromatem a endotelem jsou vytvořeny dvě specializované vrstvy – basální membrány, které kromě kolagenů běžných pro basální membránu (typ IV a VII), obsahují ještě některé další typy kolagenu. Bowmanova membrána obsahuje typ I, VI a III a matrix obsahující chondroitin a dermatan sulfát, zatímco Descemetová membrána (na hranici stroma – endotel) obsahuje síťovitě uspořádané kolageny typu V, VIII, IX a XII. To zajišťuje elasticitu a deformabilitu rohovky při zachování transparentnosti.

Zásadní pro transmisi světla je uspořádání vlastního stromatu. Je tvořeno paralelně uspořádanými vlákny kolagenu typu I (50-55%), V (10%), III (3%) a VI. Pro

transparenci rohovky je nutné zachování určité kritické tloušťky vláken (do 30nm) a interfibrilární vzdálenosti (55nm). Předpokládá se, že kolagen typu I je kodistribován s kolagenem typu V, který ovlivňuje tvorbu fibril a jejich tloušťku. Tloušťku fibril rovněž ovlivňuje přítomnost určitých glykosaminoglykanů (GAG). Přesné paralelní uspořádání rohovky se mění v oblasti limbu a stabilizuje tak rohovkové zakřivení a optické vlastnosti (Forrester, 2002a; Whikehart, 2003).

Hlavním glykosaminoglykanem rohovky je keratan sulfát. V centrální oblasti rohovky se vyskytuje také nesulfovaný chondroitin, směrem k periférii je druhým nejzastoupenějším GAG chondroitin sulfát. (Vzhledem k tomu, že chondroitin-4-sulfát a dermatan sulfát jsou téměř identické, někteří autoři se domnívají, že jde v rohovce o dermatan sulfát). Oba dva GAG se váží na specifická místa kolagenu a toto uspořádání zřejmě zajišťuje přesné uspořádání a velikost interfibrilárních prostorů. Vysoký obsah glykosaminoglykanů umožňuje vysokou hydrataci rohovky. Rohovka je hydratovaná asi z 80%. Přesto, že je to více než hydratace ostatních tkání (skléra 70%), je rohovka schopna dále ochotně vodu přijímat (Scott, 1992).

Základní funkcí endotelu je udržení normální hydratace a transparence rohovky. To se děje pomocí tzv. aktivního endoteliálního transportního mechanismu pracujícího na principu Na-K dependentní ATPásové pumpy, který neustále transportuje vodu ven ze stromatu. Pro jeho funkci je zásadní dostatečný přísun kyslíku. Základním mechanismem je Na-K ATPasová aktivita. Současné studie ukazují, že se dále na procesu podílí Na-H výměník. Tento antiport zajišťuje intracelulární pH (Čejková, 1996; Barr, 1980; Bonanno, 1987; Forrester, 2002a) (Obr.6).

Rohovkové stroma podléhá neustalé, ale velmi pomalé homeostatické remodelaci. Mezi kolagenními vlákny v substantia propria se nacházejí buňky

rohovkového stromatu – keratocyty. Keratocyty jsou nepostradatelné pro hojení rohovky, protože svojí metabolickou a mitotickou aktivitou rohovku remodelují (Fini, 1999; Čejková, 1996). Homeostatická remodelace probíhá velmi pomalu. Obrat složek extracelulární matrix není detekovatelný po řadu měsíců. Rohovka je velmi odolná k podnětům včetně mechanického poškození, které by normálně v jiných tkáních stimulovaly remodelaci a vyvolaly aktivaci fibroblastů a depozici a remodelaci vazivové tkáně. Rohovka je z imunologického hlediska privilegovaným místem, což znamená, že je relativně chráněná proti imunitní odpovědi na cizí i vlastní antigeny, která by s sebou nesla nebezpečí destrukce tkáně. Její odolnost na mechanické poškození umožňuje provádět zákroky refrakční chirurgie, protože relativní nedostatek fibrotické odpovědi ve stromatu umožňuje hojení po chirurgických incizích bez jizvení. Zdá se, že tyto mechanismy slouží pro udržení přesného uspořádání buněk a složek extracelulární matrix v rohovkovém stromatu, které je zásadní pro funkci rohovky. Zároveň tak předurčuje rohovku k využití jako modelu pro studium mechanismů regulujících aktivaci fibroblastů i v základním výzkumu (Forrester, 2002a).

1.2.2 Rohovka v podmínkách hypoxie

Hypoxie rohovky je studována zejména v souvislosti s využitím kontaktních čoček. Za jeden z následků chronické hypoxie rohovky vznikající při nošení kontaktních čoček je považován vznik neovaskularizace rohovky (Polse, 1990; Efron, 1999). Akutní hypoxie působí snížení aktivity Na-K ATPasy, což vede ke vzniku edému rohovky a hromadění laktátu. Oba tyto faktory jsou považovány za možné stimuly pro vznik neovaskularizace rohovky (Efron, 1999). Studie se přitom opírají

především o pozorování provedená v souvislosti s výzkumem účinku kontaktních čoček. V tomto případě však nelze spolehlivě odlišit efekt mechanického dráždění, event. přímý vliv cizorodého materiálu.

V současné době v souvislosti s rozvojem refrakční chirurgie se dostává do popředí zájmu rovněž efekt vysoké nadmořské výšky na změny zakřivení rohovky. U pacientů, kteří podstoupili refrakční operaci, je po výstupu do vyšší nadmořské výšky pozorován hyperopický posun v refrakci, který zřejmě souvisí se změnou hydratace rohovky při hypoxii. Jedná se o změny přechodné. Obdobné změny v refrakci jsou u obdobné skupiny pacientů popisovány i po spánku. Změny ve vaskularizaci rohovky nejsou popisovány (Karakucuk, 2000; Winkle, 1998; Morris, 2007; Morris, 2006; Karadag, 2009). Je známo, že obsah kyslíku při zavřených očích klesá na 7%-5% a působí fyziologický pospánkový edém rohovky. Jako minimální hodnota EOP (ekvivalentní procentuální množství kyslíku, označuje množství kyslíku propuštěného kontaktní čočkou odpovídající procentuální hodnotou množství kyslíku v okolní atmosféře) kontaktních čoček pro bezpečné prodloužené nošení byla přitom stanovena hodnota 12% a za hodnotu zajišťující normální rohovkový metabolismus se považuje hodnota EOP 18% (Holden, 1984; Háčiková, 2000).

Při studiu vlivu hypoxie na rohovku nebylo prokázáno poškození epitelu (Mastropasqua, 1998; McNamara, 1999). Při studiu změn epitelu v souvislosti s nošením kontaktních čoček se jeví jako zásadní mechanické poškození (Čejková, 1992).

Chronická hypoxie však může způsobit změny v dalších vrstvách rohovky a indukovat neovaskularizaci. V experimentální studii byly laboratorní potkani vystaveny hypobarické hypoxii odpovídající 5 500 m n.m (350 mmHg) a pO_2 76 mmHg (10%) 30dní. Rohovky byly následně analyzovány histologicky a byl

pozorován výskyt cév ve stromatu rohovek vystavených hypoxii se známkami proliferace, přítomnost polymorfonukleárních leukocytů, zesílení Descemetové membrány a histologické změny na úrovni endotelu (Mastropasqua, 1998).

1.2.3 Význam matrixových metaloproteinás v rohovce

Remodelace rohovkové tkáně se účastní matrixové metaloproteinasy. Změny v aktivitě metaloproteinás jsou sledovány v rohovce především v souvislosti se studiem hojení vředu rohovky různé etiologie. Jako zdroje kolagenas byly identifikovány epitelové buňky, buňky zánětu (neutrofilů) i rohovkové fibroblasty (keratocyty). V první fázi tvorby vředu jsou zřejmě hlavním zdrojem neutrofilů, syntéza kolagenas fibroblasty dosahuje vrcholu až ve fázi hojení. Proces konečné remodelace rohovky probíhá následně měsíce i roky a během tohoto období dochází k zvýšenému obratu kolagenu, což potvrzuje roli MMP's v procesu remodelace. Z normální rohovky králíka, potkana nebo z rohovky lidské byl extrahován pouze proenzym MMP-2. Dle pokusů s využitím králičího modelu po 24 hodinách po rohovkovém poškození dochází k expresi kolagenasy (MMP-1) a stromelysinu (MMP-3), zvyšuje se tvorba proMMP-2 a objevuje se aktivní forma MMP-2. Vrchol exprese je dosažen asi po 2 týdnech po poranění. Mezi 4-8 týdnem dochází k poklesu exprese, ale změny v expresi MMP's jsou v rohovce detekovatelné ještě po 7-9 měsících. Při indukci a modulaci tohoto procesu hrají zřejmě zásadní úlohu změny v poškozené tkáni. Epitelové buňky rohovky jsou schopné produkovat substance regulující syntézu MMP's (IL-1 α , TGF- β 2). Kromě toho migrují do poraněné rohovky makrofágy a další zánětlivé buňky, které mají rovněž schopnost stimulovat expresi MMP. MMP-9 je exprimována především

v souvislosti s reepitelizací rohovky. Exprese byla popsána v epitelových i stromálních buňkách. Maxima dosahuje již po 2 dnech a klesá pod hladinu detekovatelnosti po 2-4 týdnech. MMP-2 i MMP-9 jsou považovány za enzymy účastnící se novotvorby cév. MMP's jsou produkovány endoteliálními buňkami invadujících cév, ale rovněž buňkami okolního stromatu (Fini, 1995; Fini, 1998; Fini, 1999; Matsubara, 1991). V modelu neovaskularizace rohovky vyvolané zánětem korelovaly hladiny MMP-2 mRNA s tvorbou novotvořených cév (Kvanta, 2000).

1.3 Čočka

1.3.1 Stavba a základní vlastnosti

Čočka je tvořena vysoce organizovaným systémem specializovaných buněk, tzv. čočkových vláken. Transparence čočky je zajišťována přesným tvarem, strukturou a biochemickými pochody.

Čočka je normálně avaskulární a je vyživována z komorové vody a sklivce. Čočka roste a mění svůj tvar během celého života.

Na povrchu čočky je pouzdro – zesílená basální membrána produkována epitelovými buňkami čočky a čočkovými vlákny. Čočkový epitel se nachází pouze pod pouzdem na přední ploše čočky. Jde o jednovrstevný, kubický epitel. Buňky jsou vyšší směrem k ekvátoru čočky, kde postupně tvoří čočková vlákna. Postupně ztrácejí jádro a posouvají se do hlubších vrstev čočky. Pouze buňky čočkového epitelu mají všechny typické buněčné funkce. Mitotická aktivita je nejvyšší v preekvatoriální a ekvatoriální oblasti epitelu, nazývané germinativní zóna (Forrester, 2002b; Menko, 2002) (Obr. 7).

Čočková vlákna obsahují vysokou koncentraci proteinů zodpovědných za uniformní refrakční index vláken a minimalizující světelný rozptyl. Maturovaná čočková vlákna nemají zachovanou schopnost nahradit poškozené makromolekuly, mají pouze omezenou kapacitu opravit poškozené proteinové makromolekuly a mají nízkou hladinu obrany proti externím inzultům. Zásadní význam pro udržování vodní a iontové rovnováhy v čočce, která funguje jako syntitium, má tak epitel. Proto faktory narušující funkci epitelu (př.ionizující záření) má zásadní vliv na transparentci čočky (Forrester, 2002a; Whikehart, 2003; Spector, 1995). Čočka je avaskulární orgán oddělený od okolí vazivovým pouzdrem, s účinnou bariérou mezi krví a komorovou vodou. Je tak chráněna proti bakteriální a virové invazi. Vzhledem k své funkci fokusovat světlo na sítnici je však potenciálně vystavena reaktivním sloučeninám vznikajících z kyslíku účinkem světla. Předpokládá se, že tenze kyslíku v nejbližším okolí je nízká, méně než 30 mmHg. Přesto je to hodnota umožňující do určité míry aerobní metabolismus a je dostatečná jako potenciální zdroj kyslíkových radikálů (ROS).

Čočka je stabilně vystavena účinku oxidačních látek včetně účinku peroxidu vodíku, který je přítomen v komorové vodě a také sama čočka má peroxidasovou aktivitu. Obsahuje několik antioxidačních enzymových systémů: katalasu, peroxid dismutasu, glutathion peroxidasu, glutathion-S- transferasu. Čočka též obsahuje velké množství glutathionu (3.5-5.5 $\mu\text{mol/g}$ suché váhy). Největší koncentrace je v epitelu. Glutathion je v čočkových buňkách produkován interakcí mezi glutamátem a cysteinem. Glutathion je významný pro ochranu thiolových skupin proteinů, zejména kationty transporujících membránových proteinů v čočce. Více než 95% glutathionu je v redukované formě (Štípek S, 2000b; Spector, 1995; Giblin, 1990; Lou, 2000) .

1.3.2 Katarakta

Nejčastějším onemocněním čočky je katarakta. Při ní dochází vlivem různých podnětů k narušení přesné organizace čočky či jejího metabolismu. Důsledkem je tvorba vakuol mezi jednotlivými buňkami, akumulace insolubilních proteinových agregátů a chromoforů v jádře a ztráta transparence čočky (Whikehart, 2003; Forrester, 2002a).

Nejčastějším typem katarakty je katarakta související s obecným procesem stárnutí, tzv. senilní katarakta. Během posledních 15 let bylo prokázáno, že jde o proces multifaktoriální, při němž dochází k mnohočetným biochemickým změnám. Dochází při něm k nárůstu insolubilních komponent čočky, k nárůstu chromoforů, zvýšení výskytu proteinových crosslinking produktů a agregaci a oxidaci aminokyselinových skupin. Tyto změny souvisí částečně s postranlačními změnami proteinů ve vnitřních vrstvách čočky, kde prakticky nedochází k syntéze nových proteinů a jednotlivé proteiny jsou zde přítomné mnoho let. Posttranslační reakce zahrnují racemizaci, glykaci, degradaci terminálních COOH-skupin, deamidaci, nekovalentní agregaci (Obr. 8). Kromě toho se může měnit v čase exprese jednotlivých genů pro krystaliny. Vzhledem k tomu se významně mění jejich složení mezi vnitřními „starými“ částmi čočky a oblastmi „mladšími“, povrchově uloženými. Zároveň dochází k snižování hladiny glutathionu, snižování aktivity antioxidačních systémů a nárůstu proteolytické aktivity. Podle některých autorů však tyto změny nesouvisí s absolutním poklesem aktivity uvedených obranných systémů, ale se změnou poměrného zastoupení oblastí metabolicky aktivních k centrálně uloženým oblastem s buňkami již bez metabolických funkcí. Současný pohled předpokládá, že oxidativní pochody jsou pro vznik katarakty zásadní (Whikehart, 2003; Forrester, 2002a; Čejková, 2000; Spector, 1995; Yeum, 1999; Kao, 2002).

1.3.3 Sekundární katarakta, studium buněk čočkového epitelu

V současné době se operace katarakty provádí tzv. technikou extrakapsulární extrakce čočky (ECCE). Při ní je otevřeno přední pouzdro čočky, odsáty zkalené hmoty čočky a do původního pouzdra čočky vložena umělá nitrooční čočka (Obr. 9). Nejčastější komplikací po operaci katarakty je tzv. sekundární katarakta. Při ní dochází k proliferaci a migraci čočkových buněk (lens epithelial cells, LEC's), které do určité míry zůstávají přítomné v oblasti ekvátoru původního pouzdra čočky, na zadní pouzdro a mohou tak způsobit opětivný pokles vizu (Obr. 10). Buňky zároveň získávají některé charakteristiky mezenchymálních buněk (exprimují α -aktin hladkých svalových buněk, α -SMA), proces označovaný jako epitel-mezenchymální transdiferenciace nebo metaplasie. Následná přítomnost kontraktálních elementů v buňkách může přispět k nařazení pouzdra čočky a k tím k dalšímu poklesu transparence (Kurosaka, 1996; Marcantonio, 1999; Nagamoto, 2000; Bertelmann, 2001; Marcantonio, 2003; Aslam, 2003; Nishi, 1999). Příčiny a možnosti ovlivnění této nežádoucí proliferace buněk čočky jsou intenzivně studovány. Mnoho studií se soustředilo na objasnění vlivu různých růstových faktorů v tomto procesu (Hales, 1994; Liu, 1994; Kurosaka, 1995; Nishi, 1996; Lee, 1999; Meacock, 2000; de Longh, 2005). Jedním z významných faktorů produkovaných buňkami čočkového epitelu je transformující růstový faktor beta (TGF- β). TGF- β *in vitro* inhibuje buněčnou proliferaci buněk čočkového epitelu. *In vivo* jeho přítomnost v komorové tekutině zajišťuje mitotický klid centrálního čočkového epitelu (Kurosaka, 1994; de Longh, 2005). Je navíc klíčovým faktorem při indukci mezenchymální transdiferenciace buněk čočkového epitelu a exprese α -SMA. Paradoxně však zároveň indukuje buněčnou apoptózu (Hales, 1994; Hales, 1995; Liu, 1994). Při vzniku sekundární katarakty je tak zřejmě klíčová jeho souhra s dalšími růstovými faktory, např. FGF,

který zvyšuje proliferaci buněk a tak zajišťuje jejich přežití (Mansfield, 2004; Nishi, 1996). Proliferace a exprese α -SMA může být navíc ovlivněna i kultivačním substrátem (Kurosaka, 1999; de Jong-Hesse, 2005). Vliv složení extracelulární matrix na proliferaci a fenotyp různých typů buněk byl opakovaně popsán (Greenburg, 1986; Iwig, 1989; Iwig, 1991; Wu, 1995; Oharazawa, 1999; Engler, 2004). Rovněž bylo dokumentováno, že různé materiály nitroočních čoček způsobují různou míru fibrosní metaplasie (Ursell, 1998) a složení pouzdra čočky po operaci katarakty hraje významnou úlohu v regulaci proliferace a diferenciaci buněk čočkového epitelu (Saika, 1998). Přes velkou pozornost, které se studiu faktorů ovlivňujících proliferaci a diferenciaci (transdiferenciaci) buněk čočkového epitelu věnuje, nejsou vždy výsledky studií jednotné. Jedním z důvodů je fakt, že schopnost buněk čočkového epitelu proliferovat významně klesá s věkem a kolísá i dle typu katarakty. To může hrát významnou úlohu při použití buněk získaných od lidských donorů při operaci katarakty (Francois, 1978). Toto může být eliminováno při použití zvířecího modelu. Výsledky pokusů na zvířecích buňkách však mohou mít omezenou platnost pro aplikaci na člověka. Dalším důvodem nejednotnosti výsledků mohou být rozdílné kultivační podmínky. Některé studie popsaly závislost exprese α -SMA buňkami epitelu čočky na koncentraci séra v kultivačním mediu (Ong, 2003; Liu, 1996; Kim, 2004). Buňky čočkového epitelu a povrchová kortikální vlákna jsou in vivo vystavena koncentraci sérových proteinů méně než 0,1%. Výjimku představují situace, kdy dochází k poruše bariéry krev-komorová tekutina nebo krev-sítnice, kdy může koncentrace sérových proteinů stoupnout až k 10%. In vitro byla popsána exprese markerů normální diferenciaci čočkových buněk při koncentracích séra 1, 3 nebo 4% (Ong, 2003). Naopak za použití kultivačního media s obsahem séra 10%

nebo více byla pozorována transdiferenciace buněk čočkového epitelu (Kim, 2004; Nagamoto, 2000).

V posledních letech je intenzivně studován vliv ROS na proliferaci různých typů buněk.

Studie prokázaly, že oxidanty mohou fungovat jako časně růstové signální molekuly a že aktivují signální cesty, které jsou rovněž aktivovány růstovými faktory (Davies, 1999; Park, 2001; Chen, 2000). V souvislosti s proliferací epitelálních buněk čočky byl zejména studován efekt peroxidu vodíku (H_2O_2). Bylo prokázáno, že peroxid vodíku může ovlivnit mitotickou aktivitu epitelálních buněk čočky. Tento efekt je závislý na dávce (Ohguro, 1999). Z uvedené studie vyplývá, že H_2O_2 může v subtoxických koncentracích fungovat jako signální molekula. Efekt peroxidu vodíku je dále závislý na počtu kultivovaných buněk. To zřejmě souvisí s větší detoxifikační kapacitou většího počtu buněk a snad i s indukcí sekrece nějakého autokrinního faktoru zvyšující přežití a proliferaci buněk. Byl rovněž pozorován efekt insulinu a epidermálního růstového faktoru (EGF) na proliferaci buněk čočkového epitelu při současné sublethální dávce H_2O_2 . Při této dávce dochází bez přítomnosti dalších růstových faktorů k zástavě proliferace buněk. V přítomnosti insulinu nebo EGF však buňky dále proliferovaly. Obdobný efekt byl pozorován u endotelových buněk umbilikální vény. Při expozici vaskulárnímu endoteliálnímu faktoru (VEGF) a basickému fibroblastovému růstovému faktoru (bFGF) byly buňky odolnější vůči oxidativnímu stresu. Autoři referovali o aktivním defenzním mechanismu, který zahrnoval tvorbu NADPH cestou pentosového cyklu metabolismu glukosy a zvýšenému obratu glutathionu a glutathionperoxidasy (Yang, 1997). Obdobný mechanismus se může uplatňovat i v případě efektu EGF a insulinu na epitelové buňky čočky.

Byl studován rovněž efekt NO na proliferaci buněk čočkového epitelu. Byl identifikován jako faktor zajišťující přežití buněk v in vitro podmínkách (Chamberlain, 2008).

2 Hypotézy a cíle práce

2.1 Vliv hypoxie na změny extracelulární matrix rohovky

Za hypoxických podmínek se v tkáních uvolňuje zvýšené množství reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (ROS a RNS), které mohou následně vést k poškození extracelulární matrix tkáně. Toto poškození nebo i samotné reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku mohou dále aktivovat enzymy (např. metaloproteinasy) vedoucí k remodelaci a obnově poškozené tkáně.

Cílem těchto experimentů bylo ověřit hypotézu, že expozice rohovky chronické hypoxii vede v rohovce ke zvýšené produkci reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku. Tyto sloučeniny aktivují kolagenolytické enzymy, které způsobí přestavbu rohovkového stromatu.

2.2 Vliv kultivačního podkladu na proliferaci buněk čočkového epitelu a expresi α -SMA

Sekundární katarakta je v současné době nejčastější komplikací po operaci katarakty. Objasnění mechanismů a faktorů regulujících proliferaci a transdiferenciaci buněk epitelu čočky je nezbytné pro možné ovlivnění vzniku sekundární katarakty. Je popsán vliv složení extracelulární matrix na růst a fenotyp různých typů buněk. Zároveň je dobře zdokumentováno, že různé typy materiálů používaných pro výrobu umělých nitroočních čoček způsobují různý stupeň fibrózní metaplasie a sekundární katarakty.

Cílem našich experimentů bylo objasnit vliv běžných podkladů používaných při pěstování buněčných kultur na expresi α -SMA v kulturách epitelových buněk čočky.

Vzhledem k tomu, že výsledky předešlých studií v této oblasti jsou nejednoznačné, zaměřili jsme se rovněž na možný vliv dalších kultivačních podmínek, jako je režim výměny kultivačního media, suplementace fetálním sérem, buněčná densita a možné rozdíly primární a sekundární kultury.

2.3 Oxidanty a antioxidanty jako faktory regulující proliferaci buněk epitelu

čočky

Z předešlých studií na různých buněčných typech je známo, že oxidanty (např. H_2O_2) i antioxidanty (např. vitamin A, vitamin E) mohou působit za určitých podmínek jako faktory ovlivňující buněčnou proliferaci.

Cílem těchto experimentů bylo objasnit efekt nízkých koncentrací peroxidu vodíku (H_2O_2), retinolu a α -tokoferolu na proliferaci buněk epitelu čočky in vitro.

3 Vlastní experimentální práce

3.1 Vliv hypoxie na změny extracelulární matrix rohovky

3.1.1 Materiál a metody

3.1.1.1 Expozice hypoxii

Samci laboratorního potkana kmene Wistar (cca 180 g) byli vystavováni hypoxii v isobarické hypoxické komoře ($F_{iO_2}=0,1$) (Hampl a Herget, 1990). Koncentrace kyslíku byla monitorována a regulována. CO_2 byl adsorbován KOH a natronovým vápnem a nadměrná vlhkost byla kondenzována v lednici a adsorbována silikagelem. Potkani byly vystavovány hypoxii po dobu 4 dnů, 14 dnů a 3 týdnů. Každá pokusná skupina měla vlastní kontrolní skupinu.

3.1.1.2 Stanovení vaskularizace rohovky

Osm zvířat vystavených hypoxii po dobu 3 týdnů a šest zvířat kontrolních bylo anestetizováno Thiopentalem a jejich rohovka byla fotografována na štěrbinové lampě digitální kamerou. Získaná obrazová dokumentace byla dále analyzována pomocí počítačového zpracování obrazu. Míra vaskularizace byla hodnocena jako vzdálenost prorůstajících cév od limbu do středu rohovky.

3.1.1.3 Zpracování rohovkové tkáně

Bulby byly enukleovány a rohovky odebírány pod lupou ihned po usmrcení zvířete vysokou dávkou Thiopentalu. Byla odebírána centrální čirá rohovková tkáň bez proužku perilimbálního zašednutí (průměr odebraného terčíku 4 mm). Ihned po

odběru byla tkáň dále rozstříhána na drobné části, promyta v destilované vodě a zamražena.

3.1.1.4 Analýza kolagenních proteinů v rohovce

K analýze byly použity rohovky zvířat vystavených hypoxii po dobu 4, 14 nebo 21 dnů. Každá pokusná skupina měla vlastní kontrolní skupinu. Zamražená tkáň byla lyofilizována a pepsinována ve 100 μ l 10% roztoku pepsinu (1mg pepsinu/1ml CH_3COOH), pH 2,5 na 1mg suché váhy tkáně 4 h při pokojové teplotě a dále 20 h při teplotě 4 °C a následně byly vzorky zcentrifugovány (8000xg, 30min) (Novotná a Herget, 1998). Supernatant byl lyofilizován.

Gelová elektroforetická separace (SDS-PAGE) byla provedena dle Laemmliho na diskontinuitním vertikálním gelu za použití 4% zaváděcího gelu a 7,5% separačního gelu. Vzorky byly rozpuštěny ve vzorkovém pufru v koncentraci 4 g/ml a 12 μ g kolagenní frakce bylo nasazeno na proužek. Standard kolagenu I (Sigma) byla nanesen v množství 8 μ g na proužek. Elektroforetická separace byla provedena v Tris-glycinovém pufrovém systému bez redukce v Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, USA). Gely byly barveny pro zobrazení proteinů v roztoku 0,25% Coomassie Brilliant Blue R v methanol-kyselina octová-voda (40:10:50 v/v/v). Odbarvení bylo provedeno v roztoku methanol-kyselina octová-voda (40:10:50 v/v/v). Gely byly analyzovány densitometricky za použití programu pro měření elektroforetických densit ElfoMan 2.0 (ing. Jiří Semecký, Praha, ČR).

3.1.1.5 Zymografie

Kolagenolytické enzymy byly z lyofilizované tkáně rohovek extrahovány pomocí neredukujícího pufru pro vzorek (1,5% SDS, 15% glycerol, 0,025% bromfenolová modř) v množství 50 µl/ 1mg suché váhy tkáně při 4°C po dobu 22 h a separovány 10% SDS-PAGE obsahující 0,1% želatiny. Pro odstranění SDS byly gely promývány 30 min v 2,5% (v/v) Triton X-100 a Triton byl poté odstraněn promytím gelů v destilované vodě a inkubačním pufru (50 mM Tris-HCl, pH7,8; 10 mM CaCl₂; 10 mM NaCl). Gely byly inkubovány v inkubačním pufru 17 h, při 37°C. Gely byly barveny v roztoku 0,25% Coomassie Brilliant Blue R v methanol-kyselina octová-voda (40:10:50 v/v/v). Odbarvení bylo provedeno v roztoku methanol-kyselina octová-voda (40:10:50 v/v/v). Byly použity vysokomolekulární standardy molekulové hmotnosti (Pharmacia Biotech, USA). Lytické zóny byly analyzovány densitometricky za použití programu pro měření elektroforetických densit ElfoMan 2.0 (ing. Jiřím Semeckým, Praha, ČR).

3.1.1.6 Stanovení 3-nitrotyrosinu metodou ELISA

Jemně nastříhané rohovky byly homogenizovány ultrazvukem čtyřikrát 1s (100 W) a extrahovány v 250 µl isotonického pufru pufrovaného Tris pH 8,4 (TBS) po dobu 3 hod při 4°C. Poté byly vzorky zcentrifugovány a supernatant použit pro stanovení koncentrace 3-nitrotyrosinu (viz níže) a pro stanovení koncentrace bílkovin (Smith et al., 1985).

Ke stanovení koncentrace 3-nitrotyrosinu byla použita mírně modifikovaná metoda dle Hergeta (Herget et al, 2000). Polystyrenové destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy bovinním serumalbuminem (BSA) nitrovaným tetranitromethanem rozpuštěným v PBS v koncentraci 5 nM (vzhledem k nitrotyrosinu). Nespecifická

sorbce destiček byla blokována PBS s 0,05% Tween-20 (TPBS) po dobu 15 min. Poté bylo napipetováno 50 μ l naředěného standardu (peroxynitritem nitrovaný BSA) nebo zkoumaného vzorku v TBS s 0,2% želatiny, pH 8,4 a přidáno 50 μ l v témže pufru naředěné (1:125 000) ascitické tekutiny námi připravené monoklonální protilátky NO-60-E3 a inkubováno 90 min při laboratorní teplotě za mírného třepání. Poté byly destičky třikrát opláchnuty v PBS a přidáno 100 μ l/jamku antimýšší králičí protilátky konjugované s peroxidasou (SwAR/Px, Sevapharma, ČR) ředěné 1:1000 v 1% BSA v PBS a opět inkubovány po dobu 90 min. Dále byly vzorky pětkrát opláchnuty TPBS a byla provedena barevná reakce s o-fenylendiaminem. Reakce byla zastavena po 30 min přidáním kyseliny sírové. Absorbance byla odečtena při 492 nm a standartní křivka a koncentrace vzorků byly vypočteny dle Rodbardovy čtyřparametrové křivky (Rodbard and McClean, 1977). Výsledky jsou uváděny jako množství nitrotyrosinu na gram bílkoviny (μ mol/g).

3.1.1.7 Měření poškození proteinů volnými radikály

Bylo měřeno radikálové poškození po expozici hypoxii 4 dny, 14 dní a 21 dní. Ke každé pokusné skupině byla skupina kontrolních zvířat (5 zvířat vystaveno hypoxii 4 dny a 5 zvířat kontrolních, 7 zvířat vystaveno hypoxii 14 dní a 6 kontrolních zvířat a 6 zvířat vystaveno hypoxii 21 dní a 6 zvířat kontrolních). Byla měřena koncentrace proteinů modifikovaných produkty volných radikálů pomocí fluoreskujících proteinových adduktů v rozpustné proteinové frakci (Gardner, 1979, Fukuzawa et al., 1985, Itakura et al., 2000). Rohovka byla homogenizována v 50 mM fosfátovém pufru, pH 7.4, homogenát byl vyčištěn centrifugací (10 000 x g, 10 min) a byla měřena trojrozměrná fluorescenční spektra v supernatantu. Ke kvantitativnímu měření byla použita excitační (360 nm) a emisní (446 nm) spektra. Hodnoty byly

vyjádřeny v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU) na mg proteinu, jak zavedeno dle Lowryho et al. (1951).

3.1.1.8 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší dostupné čistoty. Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo.

3.1.1.9 Statistická analýza

Výsledky jsou presentovány jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka. Byly statisticky zpracovány metodou ANOVA a Scheffeho testem. Statistická analýza byla provedena pomocí programu StatView 5.0, SAS Institute Inc (Cary, North Carolina). Rozdíly byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$.

3.1.2 Výsledky

3.1.2.1 Váha pokusných zvířat

Čtvrtý a 21. den byla váha pokusných zvířat signifikantně nižší než zvířat kontrolních. Potkani vystavení hypoxii vykazovaly po čtyřech dnech hypoxie váhový úbytek na rozdíl od zvířat kontrolních. Signifikantně nižší byly i váhové přírůstky zvířat vystavených hypoxii mezi čtvrtým a 21. dnem v porovnání s váhovými přírůstky kontrolních zvířat.

3.1.2.2 Vaskularizace rohovek

Při hodnocení vzdálenosti prorůstání limbálních cév do rohovky nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v míře vaskularizace rohovky mezi skupinou zvířat vystavených 3 týdenní hypoxii a skupinou kontrolní (Obr.11).

3.1.2.3 Analýza kolagenních proteinů v rohovce

V elektroforetickém profilu kolagenních bílkovin rohovek vystavených hypoxii po dobu 4 dnů, 14 dnů a 3 týdnů (Obr. 12,13) jsme neprokázali rozdíl oproti vzorkům získaných z rohovek kontrolních zvířat. Ze zastoupení jednotlivých frakcí je patrné relativně nízký podíl frakce β a γ , což svědčí pro dobrou rozpustnost kolagenu obsaženém v rohovce.

3.1.2.4 Zymografická analýza

V rohovkách zvířat vystavených 4 denní, 14 denní a 3 týdenní hypoxii i zvířat kontrolních jsme prokázali přítomnost lytické zóny v oblasti 72 kDa, odpovídající proenzymu gelatinázy A (proMMP-2) a v oblasti odpovídající aktivované formě gelatinázy A (MMP-2) (Obr. 14). Při denzitometrickém hodnocení zymografických gelů jsme neprokázali rozdíl mezi skupinami zvířat vystavených hypoxii a skupinami kontrolními.

3.1.2.5 Stanovení radikálového poškození tkáně rohovky

Pro hodnocení radikálového poškození tkáně rohovek jsme použili sledování koncentrace 3-nitrotyrosinu a koncentrace proteinů modifikovaných produkty volných radikálů pomocí fluoreskujících proteinových adduktů v rozpustné proteinové frakci.

Koncentrace nitrotyrosinu v rohovkách zvířat vystavených hypoxii po dobu 4, 14 dnů a 3 týdnů se signifikantně nelišila od vzorků získaných ze zvířat kontrolních (Obr. 15). Rovněž koncentrace fluoreskujících proteinových adduktů měřených v rohovkách kontrolních zvířat (0.128 ± 0.003 RFU/g, a v rohovkách zvířat vystavených hypoxii 4 dny (0.127 ± 0.003 RFU/g), 14 dní (0.127 ± 0.003 RFU/g) and 21 dní (0.129 ± 0.002 RFU/g) se nelišila.

3.1.3 Diskuze

Je známo, že tkáňová hypoxie indukuje v orgánech neovaskularizaci a remodelaci extracelulární matrix. Zásadní roli v tomto procesu patrně hraje poškození vznikajícími volnými radikály. Rohovka je avaskulární orgán. Za fyziologických podmínek je zásobení kyslíkem zajištěno převážně přímou difuzí z okolní atmosféry. Během zavřených očí je zásobení kyslíkem zajišťováno cévami palpebrální spojivky. PO_2 ve spojivkových kapilárách je asi 60 mmHg. Na povrchu rohovky pO_2 klesá asi na 40 mmHg. Během dlouhodobého uzavření víček dochází ke kaskádě biochemických, buněčných a mikrobiálních změn, které mohou vyústit až v zánětlivý stav, hypoxii a příznaky suchého oka, i když v míře těchto změn existují výrazné interindividuální rozdíly (Liesegang 2002). Stav hypoxie rohovky má i svůj klinický korelát, neboť se věří, že komplikace nošení kontaktní čoček (edém epitelu, tvorba mikrocyst, snížení počtu epiteliálních mitóz, neovaskularizace rohovky) jsou způsobeny redukcí v přísunu kyslíku do rohovkové tkáně (Ladage et al. 2001, Donnenfeld et al. 1991). Kontaktní čočky však mohou působit též mechanické trauma a některé studie dokládají, že toto mechanické trauma samotné může způsobovat změny v metabolismu rohovky a indukovat edém epitelu (Thoft a Friend 1975,

Čejková 1992). Rovněž je nutné vzít v úvahu možnou hyperkapnii a zvýšení teploty pod kontaktní čočkou (Mastropasqua 1998).

V naší studii jsme se zabývali otázkou, zda hypoxie okolního vzduchu indukuje neovaskularizaci v avaskulární rohovce a remodelaci proteinů extracelulární matrix podobně jak bylo popsáno ve vaskularizovaných orgánech. Předpokládali jsme, že hypoxie indukuje zvýšenou produkci kyslíkových a dusíkových radikálů, které dále mohou aktivovat kolagenolýzu a degradaci proteinů extracelulární matrix (Fini 1998). Remodelace extracelulární matrix se může účastnit při neovaskularizaci rohovky. Neproklázali jsme však zvýšení koncentrace nitrotyrosinu (markeru zvýšené produkce peroxinitritu, Beckman 1996) ani zvýšení koncentrace proteinů modifikovaných volnými radikály (lipoperoxide-related fluorophores, markery oxidačního poškození tkáně) v rohovkách laboratorních potkanů vystavených hypoxii.

Rovněž jsme v žádném testovaném časovém intervalu neproklázali rozdíl v kolagenolytické aktivitě v rohovkách zvířat vystavených hypoxii a kontrolních zvířat. Elektroforetický profil kolagenních bílkovin nebyl u zvířat vystavených hypoxii změněn a neproklázali jsme zvýšenou vaskularizaci rohovek. V předchozích pokusech v naší laboratoři bylo však prokázáno, že expozice hypoxii ve stejné hypoxické komoře za stejných podmínek indukovala vzestup kolagenolytické aktivity v plicní tkáni a v periferních plicních arteriích, což vedlo k zaznamenání nového proužku v elektroforetickém profilu kolagenních bílkovin v oblasti štěpů kolagenu (Novotná a Herget 1998). Naše výsledky jsou v rozporu s výsledky Mastropasquy et al. (1998), kteří po expozici hypoxii (pO_2 76 mmHg, 30 dní) pozorovali reorganizaci rohovkového stromatu a ztluštění Descemetovy membrány. Rovněž detekovali známky aktivní proliferace cév a neovaskularizaci. V rohovkovém stromatu popsali výskyt polymorfonukleárů, lymfocytů a makrofágů. Nelze proto vyloučit přítomnost

zánětu, který může ale nemusí být přímým důsledkem hypoxie. V našich experimentech jsme nestudovali histologické změny rohovky a nemůžeme proto vyloučit ani potvrdit možnou přítomnost zánětlivých buněk ve stromatu. Cílem naší studie byla navíc analýza centrální avaskulární části rohovky. Rovněž tak nemůžeme vyloučit možné změny vyvolané hypoxií v limbálních oblastech rohovky. Neproklázali jsme však známky pokročilé neovaskularizace rohovky, vaskularizace v limbálních oblastech se významně nelišila u rohovky zvířat vystavených hypoxii a zvířat kontrolních. Absence vaskularizace rohovky může zároveň vysvětlit absenci aktivace kolagenolýzy v případě rohovky a naproti tomu rychle se rozvíjející degradaci kolagenu v případě plicní tkáně při stejné úrovni hypoxie. Kromě toho je dále nutno uvažovat možné pohlavní rozdíly v citlivosti na hypoxii. Mastropasqua et al. použili pro své experimenty samice potkana Wistar, v našich experimentech jsme pracovali se samci. Pohlavní rozdíly v citlivosti na hypoxii byly již dříve dokumentovány (Griffin 2000, Zhao a Eghbali-Webb 2002).

V naší práci jsme se nezabývali možnými změnami ve složení non-kolagenních proteinů po expozici hypoxii. Změny v produkci proteoglykanů v závislosti na tenzi kyslíku byly popsány v různých pojivových tkáních včetně rohovky. Bylo prokázáno zvýšení obsahu keratan sulfátu v neprospěch chondroitin sulfátu (tkáňová koncentrace) za podmínek nízké dodávky kyslíku (Scott 1992). Je proto třeba dalších studií k úplnému objasnění vlivu hypoxie na tkáň rohovky.

3.2 Vliv kultivačního podkladu na proliferaci buněk čočkového epitelu a expresi α -SMA

3.2.1 Materiál a metody

3.2.1.1 Izolace buněk čočkového epitelu a primární kultura

Čerstvé prasečí oči byly získány z lokálních jatek a zpracovány během 4 hodin. Celé oko bylo desinfikováno omytím v 96% etanolu 30 s a poté opláchnuto v roztoku fosfátového pufru (PBS). Rohovka byla asepticky odstraněna a čočka byla uvolněna pomocí sterilní plastové zkumavky. Byly odstraněny případné zbytky zonulárních vláken. Celé čočky (40 čoček) byly inkubovány v 30 ml 0,03% roztoku kolagenasy (Sigma) Dulbeccově modifikaci Eaglova esenciálního media (D-MEM, Sigma) s přídavkem gentamycinu (80 $\mu\text{g/ml}$, LEK, Slovenia) 4-5 hodin při 37°C. Uvolněné buňky byly zcentrifugovány (10 min, 900g), opláchnuty v D-MEM pro odstranění zbytků roztoku kolagenázy a resuspendovány v 10 ml kultivačního media D-MEM s 10% fetálním bovinním sérem (FBS, Pansystems, Německo) a gentamycinem (40 $\mu\text{g/ml}$).

Kultivační jamky byly připraveny pomocí FlexiPERM micro 12 systému (plocha 0.2 cm², Greiner-Bio-One) adherovaného na polystyrenové Petriho misky (NUNC, Dánsko; průměr 9 cm) nebo mikroskopické podložní sklíčko (KnittelGläser, Německo). Bylo připraveno 72 komůrek na polystyrenových miskách (24 z nich bylo potaženo kolagenem typu I, izolovaný z krysích ocasů, 10 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{l/jamku}$, 24 bylo potaženo kolagenem typu IV, Sigma, 10 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{l/jamku}$ a 24 jamek bylo ponecháno nepotažených) a 48 jamek bylo připraveno na podložních sklíčkách (24 jamek bylo potaženo kolagenem typ I, izolovaným z krysích ocasů, 1mg/ml, 40 $\mu\text{l/jamku}$ a 24 bylo ponecháno bez úpravy povrchu). Úprava povrchu jamek byla

provedena několik dnů předem (40 μ l roztoku požadovaného typu kolagenu bylo nanášeno do každé jamky a následně usušeno v přes noc v biohazard boxu). Do každé jamky bylo inokulováno 100 μ l suspenze buněk). Třetí a desátý den jsme přidali 100 μ l čerstvého média a celé medium bylo měněno sedmý den kultivace. Buňky byly kultivovány 24 h, 3, 7 nebo 12 dní, poté byly kultury opláchnuty v PBS a fixovány metanolem ochlazeným na 4 °C. Fixované buňky byly testovány na expresi α -SMA a expresi α , β and γ krystalinů (viz dále).

3.2.1.2 Kultivace sekundární kultury

Prasečí bulby byly zpracovány a čočky izolovány jak posáno výše. Po inkubaci s roztokem kolagenázy byly buňky zcentrifugovány a nasazeny na 24-jamkové destičky (NUNC). Buňky získané ze 40 čoček byly inokulovány do 10 jamek. Buňky byly pěstované v D-MEM s 10% fetálního bovinního séra (FBS, Pansystem, Německo) a gentamycinem 40 μ g/ml. Do každé jamky bylo inokulováno 0,5 ml suspenze buněk a druhý den bylo přidáno dalších 0,5 ml media. Celé medium bylo vyměněno po týdnu.

Buňky dosáhly konfluence po 10 dnech. Kultury byly trypsinizovány (0,1% trypsin v PBS) a buňky nasazeny do jamek připravených pomocí FlexiPERM micro 12 systému (Greiner-Bio-One, viz výše) na polystyrenových miskách (NUNC) nebo polystyrenových miskách, které byly předem potaženy kolagenem typu I (izolovaný z krysích ocasů, 10 μ g/ml, 40 μ l/jamku) nebo kolagenem typu IV (Sigma 10 μ g/ml, 40 μ l/jamku), a na skleněných podložních sklíčkách nebo podložních sklíčkách předem potažených kolagenem typu I (izolovaný z krysích ocasů, 1 mg/ml, 40 μ l/jamku). Potažení kultivačních jamek bylo připraveno jak uvedeno výše. Pro každou experimentální skupinu bylo připraveno 18 jamek. Do každé jamky bylo nasazeno

4800 buněk ve 100 μ l kultivačního media. Čtvrtý den kultivace bylo do jamek přidáno 100 μ l D-MEM. Po 24 h, 4 dnech či 8 dnech kultivace byly kultury opláchnuty PBS a fixovány metanolem ochlazeným na 4 °C. Buňky byly následně testovány na expresi α -SMA a expresi α , β a γ krystalinu. Byla analyzována proliferace buněk na jednotlivých podkladech.

3.2.1.3 *Imunocytochemická analýza a analýza proliferace buněk*

Fixované kultury byly inkubovány 30 min s 3% roztokem prasečí krevní plasmy v PBS s 0,05% Tweenem 20 (PBS-Tween, Sigma) pro vyblokování nespecifických vazeb. Poté byly buňky opláchnuty dvakrát roztokem PBS a barveny na α -aktin hladkých svalových buněk dle instrukcí výrobce. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka proti lidskému α -SMA (Sigma, 1:200). Jako sekundární protilátka byl použit prasečí anti-myší imunoglobulin značený peroxidásou (SwAM, Sevapharma, CZ, 1:40). Vizualizace byla dokončena přidáním roztoku s obsahem 3-amino-9-ethyl-carbazolu a peroxid vodíku. Na závěr byla dobarvena buněčná jádra hematoxylinem. Pro vyloučení nespecifické reakce bylo provedeno kontrolní barvení bez primární nebo sekundární protilátky (nahrazeny PBS).

Byl počítán počet buněk na jednotlivých jamkách sekundárních kultur pomocí počítačového softwaru pro zpracování obrazu (LUCIA G, Laboratory Imaging, CZ). Byl stanoven doubling time (DT) pomocí k parameterů, které byly kalkulovány z regresní křivky po logaritmické transformaci počtu buněk (N) dle vzorce $\log N = \log N_0 + kt$. Buňky byly počítány po 24h a po 96h, protože v této době dochází k logaritmickému růstu. DT byl vypočten z parametru k regresní křivky dle vzorce $DT = \log 2/k$.

Byl rovněž spočítán počet α -SMA pozitivních buněk v každé jamce

sekundárních kultur pomocí počítačového softwaru pro zpracování obrazu (LUCIA G, Laboratory Imaging, CZ) a vyjádřen jako procento z celkového počtu buněk na jamce.

3.2.1.4 Příprava antigenů krystalinů prasečí čočky

Byly získány oční bulby ze zvířat (stáří 6-8 měsíců) z lokálních jatek a převezeny na ledu do laboratoře. Čočky byly vyjmuty a homogenizovány v PBS s 2 mM EDTA (gel filtration buffer). Pomocí chromatografie na Sepharose 6B-CL column (2.5x88cm) byly izolovány alpha a beta-krystalin a na Sephacryl-200 column (2.5x90cm) byl izolován γ -krystalin (Abbasi 1998) .

3.2.1.5 Příprava monoklonálních protilátek

Šestitýdenní samice BALB/c myši byly imunizovány intraperitoneálně prasečím krystalinem čočky (α , β nebo γ), který byl izolován jak popsáno výše, v kompletním Freundově adjuvans. Druhá imunizace byla provedena po 4 týdnech obdobným způsobem stejným antigenem v inkompletním Freundově adjuvas a poslední imunizace byla provedena po 8 intrasplenickou injekcí antigenu v PBS, pH 7.2. Splenocyty imunizovaných zvířat byly izolovány po 4 dnech a fúzovány s myelomovými buňkami linie Sp2/0 pomocí elektrofúze v izotonickém mediu (Neil and Zimmermann, 1993). Supernatanty hybridomů byly testovány pomocí imunisorbentní eseje (ELISA) na přítomnost imunoglobulinů proti původnímu imunizujícímu antigenu. Stručně, myši imunoglobuliny byly detekovány na mikrotitračních destičkách potažených 5 μ g/ml příslušného prasečího krystalinu (α , β nebo γ) v bikarbonátovém pufru při pH 9.2. Pozitivní kolonie hybridomů byly kultivovány a subklonovány nejméně dvakrát pomocí limitující diluční metody. Tři hybridomy, α -8-D5 (α -krystalin

pozitivní), β -9-F10 (β -krystalin-positivní) a γ -4-A4 (γ -krystalin pozitivní) byly použity k produkci ascitické tekutiny pomocí intraperitoneální injekce 10^6 buněk do samců BALB/c myši, kteří byli předem připraveni injekcí Freundova inkompletních adjuvans. Ascitické tekutiny byly odebrány po 10–14 dnech a skladovány s přídavkem 0.05% NaN_3 při 4°C . Specificita připravených monoklonálních protilátek byla prověřena pomocí imunoblottů s jednotlivými frakcemi krystalinů (α , β nebo γ).

3.2.1.6 Testování produkce α -, β - a γ -krystalinů buňkami epitelu čočky

Buňky byly pěstovány na kolagenu typu I, IV a na polystyrenových miskách bez úpravy povrchu. Byla sledována exprese α -, β - a γ -krystalinů v sekundárních kulturách po 4, 8 a 22 dnech kultivace.. Fixované buňky byly inkubovány 30 min s 3% roztokem prasečí krevní plasmy s PBS-Tween k vyblokování nespecifických vazeb. Následně byly buňky opláchnuty dvakrát PBS a barveny na α -, β - nebo γ -krystalin. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka proti prasečímu α -, β - nebo γ -krystalinu (α -8-D5, β -9-F10 and γ -4-A4, viz výše). Jako sekundární protilátka byl použit prasečí antimyší imunoglobulin konjugovaný s peroxidásou (SwAM, Sevapharma, CZ, ředění 1:40). Vizualizace byla dokončena přidáním roztoku s obsahem 3-amino-9-ethyl carbazolu a peroxidu vodíku. Na závěr byla buněčná jádra dobarvena hematoxylinem. Kontrolní barvení bylo provedeno bez primární nebo sekundární protilátky (nahrazené PBS) k vyloučení nespecifického barvení.

3.2.1.7 Vliv režimu výměny kultivačního media

Pro tento pokus byly použity buňky králíčích TOTL-86 linie (linie králíčích epitelových buněk čočky, dar od Dr. Noboyuki Ohguro, Osaka University Medical

School, Japonsko). Buňky byly nasazeny na 96 jamkové kultivační destičky (NUNC). Buňky byly kultivovány 24, 4 nebo 8 dnů ve 100 μ l D-MEM s 10% FBS. Čtvrtý den bylo přidáno 100 μ l media do poloviny jamek, u druhé poloviny bylo opatrně celé kultivační medium vyměněno. Následně byly kultury kultivovány další 4 dny. Na konci požadovaného kultivačního období byly kultury opláchnuty PBS a fixovány metanolem ochlazeným na 4 °C. Buňky byly obarveny hematoxilinem a celkový počet buněk byl spočítán v 6 jamkách každé skupiny. Byl stanoven doubling time (DT) z parametrů k vypočtených z regresní křivky po logaritmické transformaci počtu buněk (N) dle vzorce $\log N = \log N_0 + kt$. Počet buněk byl stanovován po 24 h a po 96h, protože v této době dochází k logaritmickému růstu buněk. DT byl vypočten z parametru k regresní křivky dle vzorce $DT = \log 2/k$.

3.2.1.8 Statistická analýza

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD). Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí metody ANOVA, byl použit Fisherův post-hoc test. Za statisticky významné byly považovány výsledky s $p < 0.05$. Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru StatView 5.0, SAS Institute Inc (Cary, North Carolina).

Statistická významnost stanovených rozdílů DT mezi kulturami buněk pěstovaných na rozdílných podkladech byla hodnocena na základě získaných k a jejich standardních chyb od průměru (S.E.M.) pomocí Studentova testu pro nepárová data.

3.2.2 Výsledky

3.2.2.1 Chování buněk v primární kultuře

V kulturách fixovaných po 24 h kultivace nebyly přítomny žádné buňky. Po čtyřech dnech kultivace se objevily malé shluky buněk, žádné buňky se nebarvily pozitivně na α -SMA. Po sedmi dnech dosáhly kultury téměř konfluence, stále nebyly přítomné buňky pozitivní na α -SMA. Po 12 dnech kultivace se některé buňky začaly barvit pozitivně na α -SMA. V původně konfluentní kultuře se opět objevily místa bez buněk (Obr. 16).

Nejhůře proliferovaly buňky na skle. Na tomto povrchu buňky nedorostly do konfluence ani po 12 dnech kultivace. Přesto se některé začaly pozitivně barvit na α -SMA. Charakteristiky růstu buněk primárních kultur na kolagenu typu I (10 μ g/ml), kolagenu typu IV a nepotažených plastických miskách se nelišily. V kulturách buněk na kolagenu typu I na skle (1 mg/ml) se kolagenní vrstva po 4 dnech kultivace kontrahovala a buňky pokračovaly v růstu na obnaženém skleněném povrchu. Růst buněk v těchto vzorcích jsme proto dále nehodnotili.

Na základě růstových charakteristik buněk primárních kultur jsme se rozhodli kultivovat primární kultury pro pokusy se sekundárními kulturami na plastických kultivačních miskách s dále neupravovaným povrchem.

3.2.2.2 Chování buněk v sekundární kultuře 1.- 4. den

V případě sekundárních kultur adheroval po 24 hod signifikantně větší počet buněk na kolagenní povrchy, tj. kolagen typu I (1192 ± 119 cells/well) a kolagen typu IV (1160 ± 159 cells/well) než na nepotažené plastické misky (781 ± 152 cells/well; $p=0,0014$, resp. $p=0,002$) a mikroskopická podložní sklíčka (711 ± 155 cells/well; $p=0,0003$, resp. $0,0004$). V počtu buněk adherovaných a kolagen typu I a IV nebyl

statisticky významný rozdíl ($p=0,7683$). Rovněž rozdíl v počtu buněk na nepotažených plastických miskách a skle nebyl statisticky významný ($p=0,5359$; Obr.17). Počet α -SMA pozitivních buněk, vyjádřený v procentech z celkového počtu, byl signifikantně vyšší na kolageni typu I (10 $\mu\text{g/ml}$, $9,3\pm 0,8\%$, $p=0,0015$), skle ($8,5\pm 2,7\%$, $p=0,0109$) a neupravených plastických miskách ($8,7\pm 1,1\%$, $p=0,0072$) než na kolagenu typu IV ($5,9\pm 1,4\%$, Obr.18 a 19). Vzorky použité ke kontrolnímu barvení nevykazovaly imunoreaktivitu.

V případě podložních skel potažených roztokem s vyšší koncentrací (1 mg/ml) došlo po 4 dnech kultivace ke kontrakci kolagenní vrstvy podobně jako v případě primárních kultur. Buňky byly malé, kulaté, s pyknotickými jádry. Vzhledem k tomu jsme dále růst v těchto vzorcích nehodnotili.

Na ostatních kultivačních podkladech se počet buněk v průběhu prvních 4 dnů kultivace statisticky významně zvýšil ($p<0,0001$). Čtvrtý den kultivace se nelišil počet buněk na kolagenu typu I (5069 ± 434 buněk/jamku) a IV (5866 ± 1044 buněk/jamku; $p=0,0609$) a mezi neupravenými plastickými miskami (3004 ± 194 buněk/jamku) a podložními skly (2390 ± 501 buněk/jamku; $p=0,1398$). Celkový počet buněk byl statisticky významně vyšší na kolagenu typu I a IV než na plastických miskách ($p<0,0001$, resp. $<0,0001$) a podložních sklech ($p<0,0001$, resp. $p<0,0001$) (Obr. 17). Počet α -SMA pozitivních buněk byl statisticky významně vyšší na podložních sklech ($19,6\pm 3,2\%$) než na kolagenu typu I ($9,5\pm 0,6\%$, $p<0,0001$), typu IV ($9,1\pm 1,7\%$, $p<0,0001$) a plastických miskách bez další úpravy povrchu ($10,32\pm 1,4\%$, $p<0,0001$). Počet α -SMA pozitivních buněk po 4 dnech kultivace navíc statisticky významně vzrostl na skle a ($p=0,0013$) a kolagenu typu IV ($p=0,0431$) v porovnání s počtem buněk po 24 h kultivace. Počet α -SMA pozitivních buněk se nezměnil na plastických miskách ($p=0,1262$) a kolagenu typu I ($p=0,9311$, Obr.18 a 20). Vzorky

pro kontrolní barvení nevykazovaly imunoreaktivitu.

Generační doba buněk rostoucích na mikroskopických podložních sklech byla 41,1 h, na plastických miskách s dále neupravovaným povrchem 36,7 h, a kolagenu typu I 34,5 h a na kolagenu typu IV 30,9 h. Generační doba buněk rostoucích na kolagenu typu I byla statisticky významně kratší než buněk rostoucích na podložním skle ($p=0,031$). Přestože rozdíly v generační době buněk rostoucích na kolagenu typu I a skle a kolagenu typu IV a plastických miskách nebyly statisticky významně rozdílné ($p=0,136$, resp. $0,075$), tendence zkracování generační doby na kolagenních podkladech je dobře patrná.

3.2.2.3 Chování buněk v sekundární kultuře 4.-8. den

Růst buněk mezi čtvrtým a osmým dnem se zpomalil v porovnání s růstem mezi prvním a čtvrtým dnem. Počet buněk na kolagenu typu I, IV a skle se nezměnil, počet buněk na plastických kultivačních miskách statisticky významně klesl ($p=0,0440$). Celkový počet buněk po osmi dnech kultivace zůstal statisticky významně vyšší na kolagenu typu I (5558 ± 895 buněk/misku) a IV (5719 ± 937 buněk/misku) než na plastických miskách (2629 ± 385 buněk/misku, $p<0,0001$, resp. $p<0,0001$) a skle (2705 ± 270 buněk/misku, $p<0,0001$, resp. $p<0,0001$ (Obr. 17). Vzhledem k tomu, že dle barevného indikátoru pH v mediu (fenolová červen) nedošlo k významné změně pH oproti fyziologickému (7,35), nebyly tyto rozdíly v růstu buněk zřejmě způsobeny hromaděním kyselých produktů metabolismu a poklesem pH kultivačního media.

Počet α -SMA pozitivních buněk během tohoto kultivačního období statisticky významně vzrostl na všech použitých podkladech (kolagen typu I $p<0,0001$, kolagen typu IV $p<0,0001$, plastické misky $p=0,0161$, sklo $p<0,0001$). Počet α -SMA

pozitivních buněk byl po osmi dnech kultivace statisticky významně vyšší na kolagenu typu I ($18,7 \pm 3,9\%$, $p=0,0399$) a IV ($22,2 \pm 3,0\%$, $p=0,0022$) než na plastických miskách ($13,1 \pm 2,0\%$). Počet α -SMA pozitivních buněk byl statisticky významně vyšší na skle než na všech dalších použitých podkladech ($44,9 \pm 6,0\%$, $p < 0,0001$) (Obr. 18 a 21). Vzorky pro kontrolní barvení nevykazovaly imunoreaktivitu.

Kultury byly rovněž testovány na produkci specifických proteinů čočky - α -, β - a γ -krystalinů, které jsou považovány za markery diferenciacce buněk čočky. Buňky se ani v jednom testovaném časovém intervalu na žádném z použitých podkladů pozitivně nebarvily na α -, β - nebo γ -krystalin.

3.2.2.4 Vliv režimu výměny kultivačního media na proliferaci buněk

Režim výměny kultivačního media statisticky významně ovlivnil proliferaci buněk. Počet buněk v tomto experimentu statisticky významně vzrostl mezi prvním (2420 ± 871 buněk/jamku) a čtvrtým dnem (5233 ± 2056 buněk/jamku, $p=0,0014$), i mezi čtvrtým a osmým dnem kultivace. Po osmi dnech byl celkový počet buněk statisticky významně vyšší v miskách, v nichž bylo čtvrtý den vyměněno celé medium (11380 ± 517 buněk/jamku) než v miskách, kde bylo pouze medium přidáno (7970 ± 1296 buněk/jamku; $p=0,0002$, Obr. 22). Generační doba buněk mezi prvním a čtvrtým dnem kultivace byla 65,6 h. Pokud bylo vyměněno celé kultivační medium, generační doba buněk během následných čtyř dnů kultivace byla 79,0 h. Pokud bylo pouze přidáno čerstvé medium, generační doba se prodloužila 139,7h. V obou případech nedošlo dle barevného indikátoru obsaženého v kultivačním mediu (fenolová červeň) během kultivace k poklesu pH.

3.2.3 Diskuze

V našich pokusech jsme prokázali zásadní rozdíly v růstových charakteristikách buněk epitelu prasečí čočky mezi primární a sekundární kulturou. Především schopnost buněk adherovat na substrát je nižší v případě primární kultury. Buňky zde potřebovaly k adhezi delší dobu než běžných 24 h. Většina buněk při fixaci po 24 h byla tak zřejmě ztracena při fixaci a rovněž tak mohla být odstraněna i část buněk z kultur fixovaných po 4 dnech. Pokud bylo kultivační medium poprvé vyměněno až po 7 dnech, adherovalo v kultuře dostatek buněk, aby dorostly do konfluentní kultury. Na rozdíl od sekundárních kultur jsme během prvních 7 dnů kultivace prokázali α -SMA pozitivní buňky v primokultuře pouze na skle. Morfologie buněk se výrazně změnila po dosažení konfluence. Při další kultivaci se znovu objevila prázdná místa v kultuře a část buněk se začala barvit pozitivně na α -SMA. Tento proces dobře odpovídá změnám pozorovatelným na zadním pouzdře při formaci sekundární katarakty po operaci katarakty. Nejprve je detekovatelná monovrstva buněk, která obvykle jen minimálně ovlivňuje vidění. Následně z některých oblastí opět buňky mizí a objevují se vícevrstevné oblasti, které tvoří struktury rozptylující světlo. Při histologickém barvení detekujeme α -SMA pozitivní buňky, dochází k zmnožení extracelulární matrix a vazivovým změnám pouzdra, které mohou vést k jeho nařasení (Marcantonio 2000, Lois 2003). Obdobný proces byl rovněž popsán při kultivaci bovinních LEC's při použití explantační techniky (Nagamoto 2000). LEC's při těchto procesech fenotypicky připomínají chování hladkých svalových buněk v in vitro kultuře, které tvoří typické útvary popisované jako "hills and valleys". Zároveň získávají částečně kontraktilní fenotyp, charakterizovaný přítomností α -SMA, který je důležitým markerem diferenciací hladkých svalových buněk stěny cév (Bačáková 1999).

Pasážované buňky vykazovaly významně vyšší schopnost adheze ke kultivačnímu podkladu. Buňky jsme zachytily na všech testovaných kultivačních podkladech již po 24 h kultivace. Typ použitého podkladu přitom ovlivnil počet adherovaných buněk.

V různých studiích byl popsán různý efekt kultivačního podkladu na expresi α -SMA. Kurosaka ve své práci popsal po šesti dnech kultivace více α -SMA pozitivních buněk na plastických miskách, kolagenu typu I a fibronektinu než na lamininu a kolagenu typu IV (Kurosaka 1999). De Jong-Hesse pozoroval více α -SMA pozitivních buněk na kolagenu typu I a fibronektinu než na plastických miskách bez další úpravy povrchu (de Jong-Hesse 2005). V obou případech byly použity epiteliální buňky prasečí čočky, shodně s našimi pokusy. My jsme prokázali významně více α -SMA pozitivních buněk na skle po čtyřech i osmi dnech kultivace. Počet α -SMA pozitivních buněk se významně nelišil po čtyřech dnech kultivace mezi kolagenem typu I, IV a neupraveným plastickým povrchem. Překvapivě jsme po osmi dnech kultivace prokázali vyšší počet α -SMA pozitivních buněk na kolagenu typu I a IV než na plastických miskách bez další úpravy povrchu, přestože počet α -SMA pozitivních buněk byl na začátku kultivace (tj. po 24 h) na kolagenu typu IV nejnižší.

Shrneme-li uvedené výsledky, můžeme konstatovat, že kultivační podklad ovlivňuje expresi α -SMA, ale není jediným faktorem. Významným faktorem ovlivňujícím expresi α -SMA je zřejmě též buněčná densita. Osmý den kultivace byl celkový počet buněk signifikantně vyšší na kolagenu typu I a IV než na plastických miskách bez další úpravy povrchu. Toto může odpovídat rovněž situaci popisované při kultivaci primárních kultur po dobu 12 dní. Rozdíly mezi uvedenými studiemi tak mohou být způsobeny rozdílnou densitou buněk v době hodnocení kultur.

Některé práce popisují rovněž vliv obsahu séra v kultivačním mediu na expresi

α -SMA u buněk epitelu čočky (Liu 1996, Ong 2003, Kim 2004). Za normální podmíněk in vivo je epitel čočky a povrchová kortikální vlákna čočky vystaven méně než 0,1% koncentraci proteinů séra. Markery diferenciacie epitelových buněk čočky byly zaznamenány při kultivaci bovinních epiteliálních buněk čočky s nízkými koncentracemi séra v kultivačním mediu (1,3 nebo 4%; Ong 2003). Naopak byla popsána transdiferenciacie buněk v myofibroblastům podobné buňky při kultivaci v mediu obsahujícím 10% a více séra (Kim 2004). Minimální rozdíl v expresi α -SMA byl pozorován při kultivaci v bezsérovém mediu a v mediu s obsahem séra 10% (Nagamoto 2000). Při použití media s 10% séra Kim et al. ve své práci rovněž prokázal, že přestože si kultivované buňky zachovaly epiteliální morfologii, exprese α -SMA detekovaná pomocí analýzy Western blott byla zvýšena a zároveň došlo k poklesu koncentrace α A a α B- krystalinů (Kim 2004). Obdobně v našich pokusech jsme neprokázali expresi markerů diferenciacie při kultivaci epiteliálních buněk čočky. Sérum tak představuje výnamný determinující faktor chování epiteliálních buněk čočky in vitro.

Vliv složení samotného kultivačního podkladu na expresi α -SMA je patrný z rozdílu v expresi α -SMA na skle a plastických miskách po osmi dnech kultivace.

Řada prací se zabývala studiem vlivu kultivačního podkladu na růstové charakteristiky buněk epitelu čočky. Bylo popsáno, že míra proliferace se zvýšila, pokud byl kultivační podklad potažen kolagenem typu I a IV. Není však jasné, zda autoři brali v úvahu rozdílný počet primárně adherujících buněk na jednotlivé podklady (de Jong-Hesse 2005). Jiní autoři neprokázali vliv kultivačního podkladu (laminin, kolagen typu IV, fibronectin) na proliferaci buněk lidské linie LEC's SRA 01/04 při kultivaci v bezsérovém mediu (Oharazawa 1999). V naší studii jsem prokázal rozdíl v DT (doubling time) při kultivaci buněk na rozdílném podkladě. DT

byl nejkratší na kolagenu typu IV, nejhůře proliferovali buňky epitelu čočky na skle.

Mezi čtvrtým a osmým dnem kultivace došlo ke znatelnému poklesu proliferace v porovnání s mírou proliferace mezi prvním a čtvrtým dnem. K podrobnějšímu objasnění příčin tohoto jevu jsme použili králičí linii LEC's TOTL-86. Prokázali jsme zásadní vliv režimu výměny media. V případě, že bylo čtvrtý den kultivace pouze přidáno čerstvé medium, byl pokles míry proliferace výraznější než pokud bylo celé medium vyměněno. To může být způsobeno nedostatkem živin a růstových faktorů v případě, kdy bylo kultivační medium pouze doplněno. Kromě toho mohou být LEC's vystaveny působení růstového faktoru, který samy produkují a který se během osmidenní kultivace v mediu hromadí. Efekt různých růstových faktorů na proliferaci a diferenciaci buněk epitelu čočky byl opakovaně popsán (Hales 1994, Hales 1995, Liu 1994, Lee a Joo 1999, Meacock 2000, de Longh 2005). Jedním z faktorů, který může být produkován samotnými buňkami epitelu čočky, je transformující růstový faktor beta (TGF- β). TGF- β inhibuje proliferaci LEC (Nishi 1996) a indukuje transdiferenciaci (změnu epiteliálního fenotypu na mezenchymální (de Longh 2005). V našich pokusech jsme však množství TGF- β v kultivačním mediu netestovali.

Naše pokusy kultivovat buňky na silnější vrstvě kolagenu demonstrovaly význam stability kultivačního podkladu (odolnost vůči trakčním silám, které vznikají při adhezi buněk) pro životaschopnost a růst buněk (Iwig a Glaesser 1985, Iwig a Glaesser 1991, Iwig 1989, Engler 2004 a,b). Ačkoli se obecně věří, že exprese α -SMA při vzniku sekundární katarakty zvyšuje kontraktilitu buněk, jejímž důsledkem může být nařazení zadního pouzdra (Kurosaka 1995), nelze vyloučit, že svou roli v tomto procesu hraje i pouhá nestabilita zadního pouzdra po operaci katarakty.

V naší práci jsme prokázali vliv kultivačního podkladu na schopnost adheze,

proliferaci a expresi α -SMA buňkami epitelu prasečí čočky. Možným mechanismem je změna v expresi adhezních molekul v závislosti na kultivačním podkladě. Změny v expresi adhezních molekul a součástí cytoskeletu byly popsány při procesu transdiferenciace epitelových buněk čočky in vivo i in vitro (Nishi 1997, Kivela a Uusitalo 1998, Saika 1998, Kim 2004). Reorganizace cytoskeletu odráží adaptaci buněk na poškození tkáně a změny v extracelulárním prostředí (Zelenka 2004). Je třeba dalších studií k objasnění vlivu změn extracelulární matrix na diferenciaci a transdiferenciaci epitelových buněk čočky. Při studiu na in vitro modelech je nutno brát v úvahu rovněž efekt režimu výměny kultivačního media, suplementace sérem a celkového počtu buněk v kultuře.

3.3 Oxidanty a antioxidanty jako faktory regulující proliferaci buněk epitelu čočky

3.3.1 Materiál a metody

3.3.1.1 Buněčná kultura

Králičí buněčná linie epitelu čočky TOTL-86 (dar Dr.Nobuyuki Ohguro) byla kultivována v T-lahvičkách nebo Petriho miskách. Ke kultivaci byla použita Dulbeccova modifikace Eaglova minimálního esenciálního media (D-MEM) obsahující 1g/l glukosy, obohacené o 50 µg/ml gentamycinu, 15 mM HEPES a 5% fetálního telecího séra. Kultury byly kultivovány ve zvlhčované atmosféře s 95% vzduchu a 5% CO₂ při 37 °C. Medium bylo celé vyměněno každý čtvrtý den. Po dosažení konfluence byly buňky uvolněny 0,1% roztokem trypsinu v PBS, suspendovány v kompletním mediu a suspenze rozdělena v poměru 1:3. Jeden díl byl dále použit k zásobní kultivaci v kultivačních lahvičkách, v dalších třech dílech byly buňky spočítány a použity k dalším pokusům.

Při vlastních pokusech byly buňky kultivovány ve stejném mediu, jako bylo použito pro subkultivaci. Buňky byly kultivovány na černých kultivačních destičkách s 96 jamkami (96F Nuclon Delta, Nunc, Dánsko). Po trypsinizaci byla připravena suspenze buněk a do každé jamky napipetováno 50 µl suspenze (dle přípravy suspenze požadované množství buněk/jamku). Po 2 dnech bylo přidáno 150 µl media obsahující testovanou látku (retinol, tokoferol acetát, peroxid vodíku, glukosaoxidasu) v určené koncentraci. Tento den je označován na grafech jako den 1. Každý druhých den byla dále vyměněna polovina media (100 µl) za čerstvé medium obsahující testovanou látku v požadované koncentraci. Kultivace byla ukončena v určené dny, medium bylo odsáto, kultury opláchnuty PBS a uchovávány při -75 °C.

3.3.1.2 Počítání buněk

Používali jsme CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, Inc., Holandsko), který používá zelenou fluorescenční barvičku (CyQUANT GR). Tato vykazuje silnou fluorescenci po navázání na buněčné nukleové kyseliny (maximum excitace/emise při 480/520 nm). Měření fluorescence bylo prováděno pomocí čtečky mikrotitračních destiček (microplate reader Genius, Tecan, Švýcarsko) při 492 nm pro excitaci a 535 nm pro emisi. Všechna měření byla prováděna na šesti vzorcích. Pro získání počtu buněk jsme sestrojili kalibrační křivku vztahu buněčné fluorescence a počtu buněk. Počet buněk byl zjišťován počítáním v optickém mikroskopu. Kalibrační křivka byla lineární až do počtu buněk 30 000/jamku. Buňky byly reprodukovatelně detekovány až do minimálního počtu 50 buněk/jamku.

3.3.1.3 Statistická analýza

Data jsou uváděna jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost byla určována pomocí nepárového t-testu a pomocí lineární regresní analýzi.

3.3.2 Výsledky

3.3.2.1 Efekt H_2O_2 na proliferaci buněk

Nejprve jsme testovali efekt bolusu H_2O_2 . Obrázek 23 zobrazuje situaci při počátečním počtu 1000 buněk/jamku. H_2O_2 byl přidán do kultivačního media v den 1 a následně každý druhý den. Je zřejmé, že 0,5 μM H_2O_2 přechodně stimuloval buněčnou proliferaci. Počet buněk se do sedmého dne kultivace statisticky významně zvýšil ($p < 0,05$; křivka 2). Dávka 32 μM H_2O_2 způsobila inhibici buněčné proliferaci

($p < 0,01$; křivka 3), která byla patrna již pátý den kultivace. Přidání $128 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ způsobilo téměř totální zástavu růstu buněk (křivka 4), ačkoli buňky zůstávaly životaschopné až do devátého dne kultivace. Použitá metoda počítání buněk umožňuje zaznamenat až minimální počet 50 buněk/jamku. Při počátečním počtu 50 buněk/ jamku jsme pozorovali statisticky významnou inhibici buněk již po přidání $2 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ($p < 0,05$; Obr. 24, křivka 3). Za této situace $0,01 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ nedošlo ke statisticky významné stimulaci proliferace (Obr. 24, křivka 1).

Z tohoto pokusu vyplývá, že efekt podaného bolusu H_2O_2 je závislý na počátečním počtu buněk. To naznačuje, že je H_2O_2 pravděpodobně rozkládán buněčnými enzymy. Proto jsme zavedli systém, ve kterém byl H_2O_2 kontinuálně generován exogenní glukosaoxidase. Studovali jsme efekt přidání glukosaoxidasy v koncentraci $1\text{-}500 \mu\text{U.ml}^{-1}$, která produkovala $1\text{-}500 \text{ pmol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}$. Obrázek 25 ukazuje experiment, při němž byl počáteční počet buněk 500/jamku.

Na počátku exponenciální fáze růstu způsobila koncentrace glukosaoxidasy $1 \mu\text{U.ml}^{-1}$ přechodnou, ale statisticky významnou stimulaci proliferace ($p < 0,01$). Stimulační efekt přidané glukosaoxidasy se postupně snižoval až ke koncentraci $50 \mu\text{U.ml}^{-1}$. Jak je patrné z obrázku 25, koncentrace glukosaoxidasy $100 \mu\text{U.ml}^{-1}$ proliferaci buněk neovlivnila. Obdobně nebyl zaznamenán žádný efekt na buněčnou proliferaci při dále stoupající koncentraci glukosaoxidasy až k hodnotě $500 \mu\text{U.ml}^{-1}$.

3.3.2.2 *Efekt α -tokoferolu na proliferaci buněk*

V další části pokusu byl efekt H_2O_2 porovnáván s efektem nejčastěji studovaných antioxidantů – D- α -tokoferolu a retinolu. D- α -tokoferol podaný jako bolus v konečné dávce $30 \mu\text{M}$ při počáteční denzitě 100 buněk/jamku zcela inhiboval buněčný růst (Obr. 26, křivka 3). Dávka D- α -tokoferol $3 \mu\text{M}$ buněčnou proliferaci

neinhibovala. Dále jsme testovali efekt D- α -tokoferol podaný v postupně snižující se dávce až k hodnotě 0,03 μ M, ale nepozorovali jsme žádný další efekt na buněčnou proliferaci. Při počáteční denzitě 1500 buněk/jamku jsme inhibiční efekt D- α -tokoferol v koncentraci 30 μ M na buněčnou proliferaci nepozorovali.

3.3.2.3 Efekt retinolu na proliferaci buněk

Obrázek 27 znázorňuje efekt bolusově podaného retinolu při počáteční denzitě buněk 1500 buněk/ jamku. Je zřejmé, že dávka 30 μ M retinolu zcela inhibovala proliferaci buněk (křivka 3). Ještě dávka 3 μ M způsobila statisticky významný pokles proliferace buněk ($p < 0,05$). Efekt retinolu nebyl závislý na počáteční denzitě buněk v rozmezí 100-300 buněk/jamku.

3.3.3 Diskuze

Závislost účinku peroxidu vodíku na buněčné densitě v kultuře byla již pozorována v předešlých studiích. Byl sledován efekt bolusu H_2O_2 na buňky králičí linie epitelových buněk čočky (5000 buněk/jamku) po 48 h. Statisticky významný vzestup počtu buněk byl pozorován po aplikaci 10 nM -1 μ M H_2O_2 . Po přidání 100 μ M H_2O_2 nebyl pozorován rozdíl v růstu buněk oproti kontrolním kulturám. Byl pozorován výrazný vliv počtu buněk na efekt H_2O_2 . H_2O_2 (100 μ M) zcela inhiboval proliferaci buněk při počátečním počtu 1250 až 2500 buněk/jamku. Při počátečním počtu buněk 5000 na jamku nebyl pozorován žádný efekt ve srovnání s kontrolními kulturami. Při počátečním počtu 10 000 buněk/jamku došlo k významné stimulaci proliferace (Ohguro 1999). Růst lidských epitelálních buněk čočky (HLE) v konfluentní kultuře s celkovým počtem buněk 5.3 mil na kultivační misku nebyl

ovlivněn přidáním bolusu 20 μM H_2O_2 , ale růst byl z 15% inhibován 30 μM H_2O_2 a ze 75% po přidání bolusu 50 μM H_2O_2 . Efekt byl odečítán 7 dní po přidání bolusu H_2O_2 . Autoři usuzují, že HLE může odolat až 0.1 mM H_2O_2 díky efektivnímu reparačnímu systému (Xing 2002). Tyto výsledky naznačují, že buňky jsou schopny rozkládat H_2O_2 v závislosti na počtu buněk a že při velmi nízkých koncentracích může H_2O_2 stimulovat buněčnou proliferaci, zatímco vyšší koncentrace proliferaci buněk inhibují.

Náš pokus objasnil další aspekty tohoto procesu. Za prvé, aktivace proliferace pomocí H_2O_2 je závislá na fázi buněčného cyklu; je nejvíce patrná na začátku exponenciální fáze růstu. Za druhé, stimulace proliferace je pouze přechodná i v případě zajištění systému (extracelulární glukosaoxidas) kontinuálně udržujícího danou koncentraci H_2O_2 . Za třetí, inhibice proliferace pomocí vyšších dávek H_2O_2 je trvalá. Za čtvrté, inhibující koncentrace nezabíjí sledované buňky.

Byla popsána inhibice proliferace buněk hladkého svalu D- α -tokoferolem. Jeho oxidační produkt D- α -tokoferylchinon ani neinhiboval ani nestimuloval buněčnou proliferaci. D- β -tokoferol, strukturní izomer D- α -tokoferolu, který vykazuje stejnou antioxidační aktivitu, je slabým inhibitorem proliferace buněk hladkého svalu, ale je schopný zamezit a zvrátit inhibici způsobenou D- α -tokoferolem. Předpokládá se, že tokoferoly a jejich deriváty inhibují proliferaci hladkých svalových buněk jiným mechanismem než principem antioxidačním účinkem (Boscoboinik 1995). Na druhou stranu, D- α -tokoferol v koncentraci okolo 1 μM stimuloval proliferaci buněk v primární kultuře fibroblastů a hladkých svalových buněk. Předpokládá se, že tento efekt je způsoben eliminací inhibice proliferace zapříčiněné peroxidy lipidů (Gavino 1981).

Naše pokusy prokázali, že epiteliální buňky čočky se chovají podobně jako hladké svalové buňky. Obdobně jako v případě hladkých svalových buněk je jejich proliferace inhibována fyziologickou koncentrací α -tokoferolu (Boscoboinik 1995).

Buňky epitelu čočky jsou rovněž schopné rozkládat α -tokoferol. Inhibiční efekt 30 μ M α -tokoferolu nebyl pozorován při vyšší buněčné densitě. Na druhou stranu, snížení koncentrace α -tokoferolu nespustilo proliferaci, jak bylo popsáno u hladkých svalových buněk (Azzi 1995).

Retinol je studován jako inhibitor proliferace různých typů nádorových buněk. Fyziologické koncentrace retinolu navázaného na přenašečový protein (retinol-binding protein; 1-3 μ M) snížily počet HL-60 buněk po 4 dnech kultivace o 20-50% (Wathne 1988). Koncentrace all-trans retinolu 1 μ M indukovala v kultuře útlum proliferace buněk prsního karcinomu. Útlum byl závislý na densitě buněk. Při počátečním počtu buněk 15 000/cm² 1-10 μ M retinol neinhiboval růst, zatímco při počátečním počtu buněk 5000/cm² došlo k významné inhibici proliferace (Prakash 2001). Na druhou stranu byla prokázána schopnost retinolu v koncentraci 200 nM a vyšší podporovat růst B buněk (Buck 1990).

V našich pokusech jsme nepozorovali žádnou aktivaci buněčné proliferace epitelálních buněk čočky po přidání retinolu. Po přidání 3 μ M retinolu byla pozorována inhibice růstu buněk. Na rozdíl od efektu α -tokoferolu nebyl efekt retinolu závislý na densitě buněk. To naznačuje, že retinol nebyl buňkami spotřebováván.

Proliferace epitelálních buněk čočky může být modulována peroxidem vodíku, α -tokoferolem a retinolem, podobně jak bylo prokázáno u jiných typů buněk. Přesto jsme u epitelálních buněk čočky pozorovali některé rozdíly v účincích těchto látek na buněčnou proliferaci oproti jiným typům buněk.

4 Souhrnné závěry

V posledních letech je intenzivně studována úloha reaktivních sloučenin kysíku a dusíku při fyziologických i patologických procesech probíhajících v organismu. Ačkoli řada studií prokázala radikálové poškození extracelulární matrix a aktivaci kolagenolytických procesů po expozici hypoxii, v našich pokusech jsme prokázali, že expozice atmosféře s 10% kyslíku nezpůsobí vzestup kolagenolýzy ani neindukuje neovaskularizaci ve tkáni rohovky. Z našich výsledku vyplývá, že hypoxie, která je dostatečná k indukci remodelace plicní tkáně, neovlivní kolagenní stroma v rohovce a nezpůsobí produkci novotvořených cév. Možným vysvětlením je fakt, že hypoxie nebyla dostatečná k vyvolání poškození tkáně rohovky, ačkoli stejná úroveň hypoxie vyvolala proliferativní změny v plicní tkáni. Zásadní rozdíl mezi plicní tkání a rohovkou spočívá ve vaskularizaci tkáně. Rohovka zůstala během expozice hypoxii avaskulární. Předpokládáme proto, že přítomnost krevních buněk produkujících radikály je zásadní pro indukci remodelace extracelulární tkáně po expozici hypoxii.

V další části našich pokusů jsme nejprve zavedli metodu kultivace epitelových buněk prasečí čočky a studovali faktory ovlivňující chování LEC v in vitro kultuře. Prokázali jsme vliv kultivačního podkladu na schopnost adheze, proliferaci a expresi α -SMA buňkami epitelu prasečí čočky. Dle našich výsledků je proliferace buněk epitelu čočky a jejich schopnost exprimovat α -SMA dále významně ovlivňována densitou buněk a režimem výměny kultivačního media. Tyto faktory je nutno brát v úvahu při dalších studiích objasňujících vliv změn extracelulární matrix na diferenciaci a transdiferenciaci epitelových buněk čočky.

Tkáňové kultury epitelálních buněk čočky (linie TOTL-86) jsme použili k testování funkce ROS (H_2O_2) a některých antioxidantů (α -tokoferolu a retinolu) jako

faktorů ovlivňujících proliferaci buněk. Proliferace epitelálních buněk čočky může být modulována peroxidem vodíku, α -tokoferolem a retinolem, podobně jak bylo prokázáno u jiných typů buněk. U epitelálních buněk čočky jsme však pozorovali některé rozdíly v účincích těchto látek na buněčnou proliferaci oproti jiným typům buněk.

5 Literatura

Abbasi A, Smith DL, Smith JB (1998) Characterization of low molecular mass gamma-crystallin fragments from human lenses. *Exp Eye Res* 67, 458-488.

Aslam, TM, Aspinall P, Dhillon B (2003) Posterior capsule morphology determinants of visual function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241, 208-212.

Azzi A, Boscoboinik D, Chatelain E, Ozer NK, Stäuble B (1993) D-alpha-tocopherol control of cell proliferation. *Mol Aspects Med.* 14(3):265-71.

Azzi A, Boscoboinik D, Marilley D, Ozer NK, Stauble B (1995) Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. *Am J Clin Nutr* 62(suppl): 1337S-1346S.

Bačáková L, Mareš V, Lisá V (1999) Gender-related differences in adhesion, growth and differentiation of vascular smooth muscle cells are enhanced in serum-deprived cultures. *Cell Biol Int* 23, 643-648.

Barr JT, Schoessler JP (1980) Corneal endothelial response to rigid contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt.* 57: 267-274.

Beckman JS (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 836-844

Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 1): C1424-37

Bertelmann E, Kojetinsky C (2001) Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol* 12: 35-40.

Bonanno JA, Polse KA (1987) Corneal acidosis during contact lens wear: effects of hypoxia and CO₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1514-1520.

Boscoboinik D, Ozer NK, Moser U, Azzi A (1995) Tocopherols and 6-hydroxy-chroman-2-carbonitrile derivatives inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by a nonantioxidant mechanism. Arch Biochem Biophys 318(1):241-6.

Buck J, Ritter G, Dannecker L, Katta V, Cohen SL, Chait BT, Hammerling U.(1990) Retinoic acid essential for growth of activated human B cells. J Exp Med 171: 1613-1624.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radical and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef heart mitochondria. Arch Biochem Biophys 180: 248-257.

Cantoni O, Boscoboinik D, Fiorani M, Stäubli B, Azzi A (1996) The phosphorylation state of MAP-kinases modulates the cytotoxic response of smooth muscle cells to hydrogen peroxide. FEBS Lett. 389(3): 285-8.

Chamberlain CG, Mansfield KJ, Cerra A (2008) Nitric oxide, a survival factor for lens epithelial cells. Mol Vis 28;14: 983-91.

Chen QM, Tu VC, Wu Y, Bahl JJ (2000) Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. Arch Biochem Biophys. 373(1):242-8.

Čejková J (1996) Fyziologie rohovky a kontaktní čočky. Sborník přednášek, Kurz kontaktologů, I. teoretická část, p.6-10.

Čejková J (2000) Reaktivní formy kyslíku a antioxidační ochrana oka. In: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, Grada Publishing, Praha, 223-228.

Čejková J, Lojda Z, Vacík J, Digenis GA, Dropcova S (1992) Histochemical changes in the rabbit cornea and plasmin activity in the tear fluid during contact lens

wear. Favourable influence of protease inhibitors (aprotinin, PC5, elastatinal).

Histochemistry 97(1): 69-76.

Čejková J, Štípek S, Crkovská J, Ardan T, Pláteník J, Čejka Č, Midelfart A (2004) UV rays, the prooxidat/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. *Physiol Res* 53: 1-10.

Davies KJ (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48(1):41-7.

de longh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW (2005) Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs* 179, 43-55.

de Jong-Hesse Y, Kampmeier J, Lang GK, Lang GE (2005) Effect of extracellular matrix on proliferation and differentiation of porcine lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243, 695-700.

Donnenfeld ED, Ingraham H, Perry HD, Imundo M, Goldberg LP (1991) Contact lens-related deep stromal intracorneal hemorrhage. *Ophthalmology* 98: 1793-1796.

Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47-95.

Efron N (1999) Neovascularisation, in: *Contact Lens Complications*, Butterworth-Heinemann, Oxford, p. 99-107

Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D (2004a) Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* 86, 617-628.

Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Fischer DE (2004b) Myotubes differentiate optimally on substrate with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol* 166:877-887.

Fini ME (1999) Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* 18(4): 529-51.

Fini ME, Cook JR, Mohan R (1998) Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl: S12-23.

Fini ME, Girard MT, Matsubara M (1992) Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl*, 202: p. 26-33.

Fini ME, Girard MT, Matsubara M, Bartlett JD (1995) Unique regulation of the matrix metalloproteinase, gelatinase B. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36(3): 622-33.

Francois J, Victoria-Troncoso V, Cansu K (1978) Tissue culture of the epithelium of the normal and cataractous adult lens. *Ophthalmologica* 177: 214-222.

Fried RL, Fried W, Babin DB (1973) Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium-reductase inhibitor. *Eur.J.Biochem*. 33: 439-445.

Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Lee W (2002a) Biochemistry and cell biology, in: *The eye: Basic sciences in practice*, W.B.Saunders, Edinburgh, str. 155-222.

Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Lee W (2002b) Anatomy of the eye end orbit, in: *The eye: Basic sciences in practice*, W.B.Saunders, Edinburgh, str.1-98.

Fukuzava K, Takase S, Tsukatani H (1985) Fluorescent pigments by covalent binding of lipid peroxidation by-products to protein and amino acids. *Lipids* 20: 854-861.

Gamou S, Shimizu N (1995) Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 357(2):161-4.

Gardner HW (1979) Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. J Agric Food Chem 27: 220-229.

Gavino VC, Miller JS, Ikharebha SO, Milo GE, Cornwell DG (1981) Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. J Lipid Res 22:763-769.

Greenburg G, Hay ED (1986) Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro. Dev Biol 115, 363-379.

Giblin FJ, Reddan JR, Schrimsher L, Dziedzic DC, Reddy VN (1990) The relative roles of the glutathione redox cycle and catalase in the detoxification of H₂O₂ by cultured rabbit lens epithelial cells. Exp Eye Res 50: 795-804.

Gopalakrishna R, Anderson WB (1989) Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase B selective oxidative modification of the regulatory domain. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6578-6762.

Griffin M, Lee HW, Zhao L, Eghbali-Webb M (2000) Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia: effects of estrogen. Mol Cell Biochem 215:21-30.

Háčiková S (2000) Vývoj prodlouženého nošení kontaktních čoček. Sborník přednášek, Kurz konatktologů, III.teoretická část, p. 16-23

Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW (1995) Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta. Invest Ophthalmol Vis Sci 36, 1709-1713.

Hales AM, Schulz MW, Chamberlain CG, McAvoy JW (1994) TGF-beta 1 induces lens cells to accumulate alpha-smooth muscle actin, a marker for subcapsular cataracts. *Curr Eye Res* 13, 885-890.

Hampel V, Herget J (1990) Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis* 142: 619-624.

Hampel V, Herget J (2000) Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* Oct;80(4):1337-72

Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L, Ostadal M (2000) A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49(5):493-501

Holden BA, Mertz GW (1984) Critical oxygen levels to avoid corneal edema for daily and extended wear contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25(10): p. 1161-7

Hoyos B, Jiang S, Hammerling U (2005) Location and functional significance of retinol-binding sites on the serine/threonine kinase, c-Raf. *J Biol Chem* 280: 6872-6878.

Imam A, Hoyos B, Swenson C, Levi E, Chua R, Viriya E, Hammerling U (2001) Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C Alpha. *FASEB J* 15: 28-30.

Itakura K, Oya-Ito T, Osawa T, Yamada S, Toyokuni S, Shobata N, Kobayashi M, Uchida K (2000) Detection of lipofuscin-like fluorophore in oxidized human low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 473: 249-253.

Iwig M, Glaesser D (1985) On the role of microfilaments in cell-shape-mediated growth control of lens epithelial cells. *Cell Tissue Kinet* 19:169-182.

Iwig M, Glaesser D (1991) Cell-substratum interactions and the cytoskeleton in cell shape-mediated growth regulation of lens epithelial cells. *Lens Eye Toxic Res* 8, 281-309.

Iwig M, Ngoli D, Glaesser D (1989) Autoradiographic investigations on cell shape-mediated growth regulation of lens epithelial cells in culture. *Biomed Biochim Acta* 48, 121-127.

Kao CL, Chou CK, Tsai DC, Hsu WM, Liu JH, Wang CS, Lin JC, Wu CC, Peng CH, Chang CJ, Kao CL, Chiou SH (2002) Nitric oxide levels in the aqueous humor in cataract patients. *J Cataract Refract Surg.* 28(3):507-12.

Karadag R, Sen A, Golemez H, Basmak H, Yildirim N, Akin A (2009) Age-related differences in central cornea thickness alterations caused by short-term hypobaric hypoxia. *Cornea* 28(2): 136-9.

Karakucuk S, Mirza GE (2000) Ophthalmological effects of high altitude. *Ophthalmic Res.* 32(1): 30-40

Kim JT, Lee EH, Chung KH, Kang IC, Lee DH, Joo CK (2004) Transdifferentiation of cultured bovine lens epithelial cells into myofibroblast-like cells by serum modulation. *Yonsei Med J* 45, 380-391.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis (1999) *Circ Res.* 84(3):253-6

Kivela T, Uusitalo M (1998) Structure, development and function of cytoskeletal elements in non-neuronal cells of the human eye. *Prog Ret Eye Res* 17:385-428.

Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21):11233-7.

Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T (1996) Presence of alpha smooth muscle actin in lens epithelial cells of aphakic rabbit eyes. *Br J Ophthalmol* 80, 906-910.

Kurosaka D, Kato K, Nagamoto T, Negishi K (1995) Growth factors influence contractility and alpha-smooth muscle actin expression in bovine lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1701-1708.

Kurosaka D, Kato K, Oshima T, Kurosaka H, Yoshino M, Ogata M (1999) Extracellular matrixes influence alpha-smooth muscle actin expression in cultured porcine lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 19, 260-263.

Kurosaka D, Nagamoto T (1994) Inhibitory effect of TGF-beta 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3408-3412.

Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B (2000) Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res.* 70:419-428.

Ladage PM, Yamamoto K, Ren DH, Li L, Jestre V, Petroll WM, Bergmanson JP, Cavanagh HD (2001) Proliferation rate of rabbit corneal epithelium during overnight rigid contact lens wear. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2804-2812.

Laemmli VK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680-685.

Lee EH, Joo CK (1999) Role of transforming growth factor- β in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 20225-2032.

Liesegang TJH (2001) Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *CLAO J* 28: 12-27.

Liu CS, Wormstone IM, Duncan G, Marcantonio JM, Webb SF, Davies PD (1996) A study of human lens cell growth in vitro. A model for posterior capsule opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 906-914.

Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, McAvoy JW (1994) Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta [see comments]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 388-401.

Lois N, Dawson R, McKinnon AD, Forrester JV (2003) A new model of posterior capsule opacification in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3450-3457.

Lou MF (2000) Thiol regulation in the lens. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000 Apr;16(2):137-48

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Mansfield KJ, Cerra A, Chamberlain CG (2004) FGF-2 counteracts loss of TGFbeta affected cells from rat lens explants: implications for PCO (after cataract). *Mol Vis.* 10:521-32.

Marcantonio JM, Rakic JM, Vrensen GF, Duncan G (2000) Lens cell populations studied in human donor capsular bags with implanted intraocular lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1130-1141.

Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS, Duncan G (2003) Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens. *Exp Eye Res* 77, 339-346.

Marcantonio JM, Vrensen GF (1999) Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye* 13 (Pt 3b), 484-488.

Mastropasqua L, Ciancaglini M, Di Tano G, Carpineto P, Lobefalo L, Loffredo B, Bosco D, Columbaro M, Falcieri E (1998) Ultrastructural changes in rat cornea after prolonged hypobaric hypoxia. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30(2): p. 285-93.

Matsubara M, Girard MT, Kublin CL, Cintron C, Fini ME (1991) Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. *Dev Biol* . 147: 425-439.

McNamara NA, Chan JS, Han SC, Polse KA, McKenney CD (1999) Effects of hypoxia on corneal epithelial permeability. *Am J Ophthalmol*. 127(2): p. 153-7

Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR (2000) Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol* 84, 332-336.

Menko SA (2002) Lens epithelial cell differentiation. *Exp Eye Res* 75: 485-490.

Misra HP, Fridovich I (1972) The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J.Biol.Chem*. 247: p. 188-192

Morel Y, Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342:481-496

Morris DS, Somner JE, Scott DM, McCormick IJ, Aspinall P, Dhillon B (2007). Corneal thickness at high altitude. *Cornea* 26(3): 308-11.

Morris DS, Somner J, Donald MJ, McCormick IJ, Bourne RR, Huang SS, Aspinall P, Dhillon B (2006) *Adv Exp Med Biol*. 588: 249-70.

Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp Fp (1997) Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 60: 1833-1845.

Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC (2000) Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1122-1129.

Nishi O, Nishi K, Fujiwara T, Shirasawa E, Ohmoto Y (1996) Effects of the cytokines on the proliferation of and collagen synthesis by human cataract lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 80, 63-68.

Nishi O, Nishi K, Akaishi T, Shirasawa E (1997) Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 579-585.

Nishi O (1999) Posterior capsule opacification. Part 1: Experimental investigations. *J Cataract Refract Surg* 25, 106-117.

Novotná J, Bíbová J, Hampl V, Deyl Z, Herget J (2001) Hyperoxia and recovery from hypoxia alter collagen in peripheral pulmonary arteries similarly. *Physiol Res*. 50(2): p. 153-63.

Novotna J, Herget J (1998) Exposure to chronic hypoxia induces qualitative changes of collagen in the walls of peripheral pulmonary arteries. *Life Sci*. 62(1): p. 1-12.

Novotná J, Herget J (2002) Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res* 51: 323-334.

Oharazawa H, Ibaraki N, Lin LR, Reddy VN (1999) The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line. *Exp Eye Res* 69, 603-610.

Ohguro N, Fukuda M, Sasabe T, Tano Y (1999) Concentration dependent effects of hydrogen peroxide on lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol*. 83(9):1064-8.

Ong MD, Payne DM, Garner MH (2003) Differential protein expression in lens epithelial whole-mounts and lens epithelial cell cultures. *Exp Eye Res* 77, 35-49.

Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK, Joo CK (2001) Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor.: *Biochem Biophys Res Commun*. 284(4):966-71

Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M (1990) Hypoxic effect on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31: 1542-1554.

Prakash P, Russell RM, Krinsky NI (2001) In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids and retinoids. *J Nutr* 131: 1574-1580.

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Gallis ZS (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro - Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* 98(11): p. 2572-2579.

Ricciarelli R, Tasinato A, Clément S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A (1998) alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J.* 334 (Pt 1): 243-9.

Saika S, Kawashima Y, Miyamoto T, Okada Y, Tanaka SI, Ohmi S, Minamide A, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A, Yamanaka A (1998) Immunolocalization of propyl 4-hydroxylase subunits, alpha-smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res* 66: 283-294.

Scott JE (1992) Oxygen and the connective tissues. *Trends Biochem Sci.* 17: 340-343.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Spector A (1995) Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *Faseb J* 9(12): 1173-82.

Stamler JF (1998) The complications of contact lens wear. *Curr Opin Ophthalmol.* 9(4): 66-71

Štípek S (2000a) Co jsou volné radikály a co rozumíme reaktivními formami kyslíku a dusíku. In: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, Grada Publishing, Praha, str. 21-37.

Štípek S (2000b) Volné radikály – dobří sluhové a zlí páni. In: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, Grada Publishing, Praha, str. 41-98.

Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG (2003) Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 10(4):418-30.

Thoft RA, Friend J (1975) Biochemical aspects of contact lens wear. *Am J Ophthalmol* 80: 139-145.

Ursell PG, Spalton DJ, Pande MV, Hollick EJ, Barman S, Boyce J, Tilling K (1998) Relationship between intraocular lens biomaterials and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* 24, 352-360.

Yang W, de Bono DP (1997) A new role for vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factors: increasing endothelial resistance to oxidative stress. *FEBS Lett* 17;403(2):139-42.

Yeum KJ, Shang F, Schalch W, Russell RM, Taylor A (1999) Fat-soluble nutrient concentrations in different layers of human cataractous lens. *Curr Eye Res* 19(6): 502-505.

Wathne KO, Norum KR, Smeland E, Blomhoff R (1988) Retinol bound to physiological carrier molecules regulates growth and differentiation of myeloid leukemic cells. *J Biol Chem* 263: 8691-8695.

Whikehart DR (2003) Proteins: Essential components of the eye, in: *Biochemistry of the eye*, Butterworth-Heinemann, Philadelphia, str.15-51.

Winkle RK et al.(1998) The etiology of refractive changes at high altitude after radial keratotomy. Hypoxia versus hypobaria. *Ophthalmology.* 105(2): 282-6.

Wilhelm J, Herget J (1999) Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the fluorescent end-products of lipid peroxidation. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 671-681.

Wu XY, Svoboda KK, Trinkaus-Randall V (1995) Distribution of F-actin, vinculin and integrin subunits (alpha 6 and beta 4) in response to corneal substrata. *Exp Eye Res* 60, 445-458.

Xing KY, Lou MF (2002) Effect of H₂O₂ on human lens epithelial cells and the possible mechanism for oxidative damage repair by thioltransferase. *Exp Eye Res* 74: 113-122.

Zelenka PS (2004) Regulation of cell adhesion and migration in lens development. *Int J Dev Biol* 48: 857-865.

Zhao X, Eghbali-Webb M (2002) Gender-related differences in basal and hypoxia-induced activation of signal transduction pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, in cardiac fibroblasts. *Endocrine* 18: 137-145.

Zkratky

α -SMA – α -aktin hladkých svalových buněk

AP – 1 – transkripční faktor AP-1

bFGF – basický fibroblastový růstový faktor

BSA – bovinní seralbumin

c-raf – gen pro c-Raf protein (protoonkogen, serin/threonin specifická kinasa)

CH₃COOH – kyselina octová

CO₂ – oxid uhličitý

D-MEM – Dulbeccova modifikace Eaglova esenciálního media

DT – doubling time

ECCE – extrakapsulární extrakce čočky

EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová

EGF – epidermální růstový faktor

EOP – ekvivalentní procentuální množství kyslíku

FBS – fetální bovinní sérum

FGF – fibroblastový růstový faktor

GAG - glykosaminoglykan

H₂O₂ – peroxid vodíku

HEPES – pufovací činidlo (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HL-60 – linie myeloidních leukemických buněk

HLE – linie lidských epiteliálních buněk čočky

IL-1 – interleukin 1

MAPK – mitogeny aktivovaná proteinkinasová kaskáda

N – počet buněk

NF- κ B – nukleární faktor κ B

NO – oxid dusnatý (nitroxid)

LDL – lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)

LEC's – buňky epitelu čočky (lens epithelial cells)

LO – lipidový alkoxylový radikál

LOO – lipidový alkylperoxylový radikál

LPO – peroxidace lipidů (lipoperoxidace)

MMP-1 (2,3,9) – matrixová metaloproteinasa typu 1 (2,3,9)

MMP's – matrixové metaloproteinasy

PBS – standardní pufovací roztok

PKC – proteinkinasa C

pO₂ – parciální tlak kyslíku

proMMP-2 (9) - proenzym matrixové metaloproteinasy typu 2 (9)

RFU – relativní fluorescenční jednotky

RNS – reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

TBS – transferový pufr

TOTL-86 – linie králičích buněk epitelu čočky

TGF β – transformující růstový faktor β

TPBS – PBS pufr s Tweenem 20

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

VLDL – lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)