

# Imunohistochemická charakterizácia kolagénu IV v zdravých rohovkách a rohovkách pacientov so zadnou polymorfnou dystrofiou

Merjavá S.<sup>1</sup>, Lišková P.<sup>1</sup>, Jirsová K.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř biologie a patologie oka, Institut dědičných metabolických chorob, VFN a 1. LF UK, Praha, vedoucí pracoviště prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.

<sup>2</sup>Oční tkáňová banka, VFN a UK, Praha, vedoucí pracoviště MUDr. Marcela Černická, MBA

## SÚHRN

**Ciel:** Cieľom tejto práce bolo zistiť výskyt jednotlivých reťazcov kolagénu IV ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$ ) v kontrolných rohovkách a v rohovkách pacientov so zadnou polymorfnou dystrofiou rohovky (ZPD).

**Metodika:** Pre experimenty bolo použitých 7 kontrolných rohoviek a 7 rohovkových terčov získaných pri keratoplastike pacientov so ZPD. Jednotlivé reťazce kolagénu IV boli detekované v kryorezoch o hrúbke 7  $\mu$ m pomocou nepriamej fluorescenčnej imunohistochemie.

**Výsledky:** V kontrolných rohovkách sa v bazálnej membráne epitelu nachádzali reťazce  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$ , v strome reťazce  $\alpha 3$  a  $\alpha 5$ . V Descemetovej membráne boli prítomné všetky reťazce kolagénu IV s výnimkou reťazca  $\alpha 1$ , ktorý bol pozitívny len u jednej kontrolnej rohovky zo siedmich. V bunkách epitelu a endotelu kontrolných rohoviek nebol kolagén IV detekovaný. U rohoviek pacientov so ZPD sa v bazálnej membráne epitelu okrem reťazcov  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$  vyskytoval aj reťazec  $\alpha 2$ , v strome boli vedľa reťazcov  $\alpha 3$  a  $\alpha 5$  detekované i reťazce  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\alpha 4$ . V Descemetovej membráne rohoviek pacientov so ZPD boli vo zvýšenej ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), zníženej ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ), alebo nezmenenej ( $\alpha 5$ ) miere oproti kontrolám prítomné všetky reťazce kolagénu IV. V bunkách epitelu a endotelu rohoviek pacientov nebol kolagén IV detekovaný.

**Záver:** Ľudská rohovka vykazuje značnú heterogenitu vo výskyte reťazcov  $\alpha$  kolagénu IV, a to predovšetkým v bazálnej membráne epitelu a v Descemetovej membráne, pre ktoré je prítomnosť kolagénu IV jednou z charakteristických črt. U pacientov so ZPD dochádza k zmenám expresie jednotlivých reťazcov kolagénu IV na úrovni Descemetovej membrány a stromy.

**Kľúčové slová:** kolagén IV, rohovka, nepriama fluorescenčná imunohistochemia

## SUMMARY

*Immunohistochemical Characterization of Collagen IV in Control Corneas and in Corneas Obtained from Patients Suffering from Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy*

The expression of all six chains of collagen IV was studied using the indirect fluorescent immunohistochemistry in seven control corneas and seven corneas obtained from patients suffering from the posterior polymorphous corneal dystrophy. Heterogeneous staining, especially in the epithelial basement membrane and Descemet's membrane, was observed in the control corneas. An increase of the staining intensity for the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains was observed, especially in the Descemet's membrane and the corneal stroma in samples obtained from the patients compared to the control tissues.

**Key words:** collagen IV, cornea, indirect fluorescent immunohistochemistry

Čes. a slov. Oftal., 64, 2008, No. 3, p. 115–119

## ÚVOD

Jedným z charakteristických rysov rohovky je jej transparentnosť, ktorá je udržiavaná usporiadaním rohovkovej stromy a funkčnosťou endotelu. Základnou extracelulárnou zložkou stromy sú kolagénové vlákna [21, 22].

Kolagén IV sa v rohovke nachádza nielen v strome, ale je predovšetkým základnou stavebnou štruktúrou bazálnych membrán (BM) [8, 10], ktoré hrajú dôležitú úlohu v bunčnej adhézii, diferenciácii a regenerácii [15]. V rohovke sú dve BM: BM epitelu (BME) a Descemetova membrána (DM).

Kolagén IV je proteín tvorený tromi reťazcami  $\alpha$  zloženými do trojzávitnice. Dodnes bolo identifikovaných 6 rôznych reťazcov  $\alpha$  ( $\alpha 1$  –  $\alpha 6$ ) kolagénu IV [24]. Triméry [ $\alpha 1$ ]<sub>2</sub> $\alpha 2$  a [ $\alpha 1$ ]<sub>3</sub> sú prítomné vo väčšine BM, zatiaľ čo reťazce  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$  sú minoritnou komponentou BM s obmedzenou tkanivovou di-

stribúciou [8]. Hlavnou funkciou kolagénu IV je tvoriť podpornú sieť. Navyše rôzne domény reťazcov  $\alpha$  môžu regulovať bunčové funkcie, akými sú anti-angiogénne a anti-tumorové vlastnosti. Reťazce  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  podporujú bunčnú migráciu, zatiaľ čo všetky ostatné reťazce majú anti-invazívny charakter [23].

Imunohistochemickou charakterizáciou reťazcov kolagénu IV v normálnej rohovke zistili Ljubimov a kol. [19] vertikálnu a horizontálnu heterogenitu v ich lokalizácii. V BME centrálnej rohovky detekovali reťazce  $\alpha 3$  –  $\alpha 5$ . Intenzita ich signálu klesala smerom k periférii. V strome rohovky detekovali reťazce  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  a  $\alpha 5$ . V DM sa na stromálnej strane nachádzali reťazce  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ , na strane endotelovej reťazce  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  a  $\alpha 5$ . Tuori a kol. [26] podobne lokalizovali reťazce  $\alpha 3$  a  $\alpha 4$  na endotelovej strane DM, ale v BME ich prítomnosť nezistili. Reťazce  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$  detekovali v BME centrálnej rohovky a na endotelovej strane DM. Reťazec  $\alpha 6$  pritom vykazoval horizontálnu heterogenitu s poklesom signálu smerom k periférii. Imunoelektronovou mikroskopiou bol pozorovaný kolagén IV na endotelovej strane DM [20].

Mutácie v génoch pre reťazce  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$  kolagénu IV podmieňujú vznik Alportovho syndrómu, dedičného ochorenia charakterizovaného hematuriou, senzorineurálnou hluchotou a očným postihnutím [16].

Zadná polymorfna dystrofia rohovky (ZPD, posterior polymorphous corneal dystrophy) je bilaterálne ochorenie rohovky s autozomálne dominantnou dedičnosťou, ktoré postihuje primárne endotel a DM [3, 4, 7].

Zmeny na úrovni endotelu pacientov so ZPD (epitelizácia a proliferácia abnormálneho endotelu) boli detailne charakterizované svetelnou a elektrónovou mikroskopiou [2, 7, 13]. Epitelizácia endotelu pacientov so ZPD bola ďalej potvrdená detekciou výskytu širokého spektra cytokeratínov, typických epiteliálnych proteínov, ktoré sa v zdravom endoteli nevyskytujú [9, 25].

Jedným z troch zatiaľ známych mutovaných génov, ktoré asociujú so ZPD, je gén pre reťazec  $\alpha 2$  kolagénu VIII (COL8A2) lokalizovaný na 1. chromozóme [1]. U jedného pacienta so ZPD bol popísaný ektopický výskyt reťazca  $\alpha 3$  kolagénu IV v bunkách endotelu rohovky v dôsledku mutácie v transkripčnom faktore 8 (TCF8, novšie nazývaný ZEB1), lokalizovanom na 10. chromozóme [12].

V rohovkách pacientov so ZPD môže dochádzať k formovaniu patologickej vrstvy na úrovni DM – zadnej kolagénovej vrstvy (posterior collagenous layer, PCL). Táto vrstva formuje ďalšiu vrstvu medzi zadnou amorfnou vrstvou (posterior non-banded layer) a endotelom. U pacientov so ZPD boli detekované všetky tri typy PCL: prúžkovaná, fibrilárna aj fibrocelulárna. Zadná kolagénohá vrstva vzniká aj v rohovkách pacientov, ktorí trpia chorobami s podobnými zmenami na úrovni zadnej časti rohovky ako sa vyskytujú u ZPD, napríklad u kongenitálnej hereditárnej endotelovej dystrofie, Fuchsovej dystrofie alebo iridokorneálneho endotelového syndrómu [27]. Pomocou imunoelektrónovej mikroskopie boli v tejto patologickej vrstve detekované kolagény I, III, V, VI a VIII [17].

Detailná lokalizácia a charakterizácia jednotlivých kolágenov u pacientov so ZPD však doteraz nebola prevedená. Cieľom tejto práce je zmapovať výskyt jednotlivých reťazcov kolagénu IV v normálnych rohovkách a rohovkách získaných od pacientov so ZPD.

## PACIENTI A METODIKA

Sedem kontrolných rohovkových terčov (K1 – K7) vylúčených z transplantáčného programu (nevyhovujúce kvalitatívne a kvantitatívne parametre endotelu, pozitívne výsledky sérologického vyšetrenia darcu) poskytla Oční tkáňová banka Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK. U darcov týchto rohoviek nebolo zaznamenané žiadne ochorenie očí a ich priemerný vek bol 63 rokov.

Sedem rohovkových terčov bolo získaných pri parciálnej perforujúcej keratoplastike pacientov so ZPD (tab. 1).

**Tab. 1. Pacienti so ZPD, od ktorých boli získané rohovkové terče (uvedený vek je vek v dobe prevedenia keratoplastiky, Ž – žena, M – muž)**

Pacienti	Vek	Pohlavie
P1	48	M
P2	56	M
P3	44	M
P4	42	M
P5	37	Ž
P6	21	Ž
P7	49	Ž
Priemer	42	

Jedna z týchto rohoviek bola získaná od pacienta pochádzajúceho z rodiny, v ktorej bolo ochorenie mapované na krátke ramienko 20. chromozómu (viď tab. 1; P1), [6]. Ďalších päť rohoviek bolo získaných od piatich pacientov, ktorí pochádzajú z rovnakej geografickej oblasti v juhozápadnej časti Českej republiky a predpokladá sa u nich rovnaká mutácia (viď tab. 1; P2, P4 – P7). Jedna rohovka bola získaná od pacienta s detekovanou mutáciou v ZEB1 géne [18] (viď tab. 1; P3). Jeden z pacientov so ZPD vykazoval na rohovkovej topografii pre keratokonus charakteristické vyvýšenie v inferotemporálnej časti rohovky (viď tab. 1; P5).

Získané rohovky boli rozdelené na tri časti, zaliate do média pre zamrazovanie tkanív (Optimal cutting temperature medium) a uchované pri teplote  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pre experimenty boli použité kryorezy o hrúbke 7  $\mu\text{m}$ , montované po štyroch na podložné sklíčka. Jeden rez na každom sklíčku bol použitý pre negatívnu kontrolu (vynechaná inkubácia s primárnou protilátkou).

Reťazce  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  a  $\alpha 6$  kolagénu IV boli detekované metódou nepriamej fluorescenčnej imunohistochemie. Rezy boli fixované 10 minút v chladenom acetóne a opláchnuté vo fosfátovom pufré (phosphate buffered saline, PBS, pH = 7,4). Následne boli rezy inkubované jednu hodinu s primárnou protilátkou riedenou v PBS s 1% boviným sérom albumínom pri izbovej teplote. Boli použité myšie a potkanie monoklonálne protilátky v nasledujúcich koncentráciách: anti-kolagén IV  $\alpha 1$  (1 : 50), anti-kolagén IV  $\alpha 3$  (1:50), anti-kolagén IV  $\alpha 5$  (1 : 50), (Wielisa, Wieslab, Švédsko), anti-kolagén IV  $\alpha 2$  (1 : 300), (Chemicon International Inc., Temecula, USA), anti-kolagén IV  $\alpha 4$  (1 : 25) a anti-kolagén IV  $\alpha 6$  (1 : 50), (poskytnuté doktorom Sadom, Japonsko). Po opláchnutí (3–5 minút v PBS) boli rezy inkubované 1 hodinu s anti-myšiacou (1 : 500) alebo anti-potkaňou (1 : 100) IgG sekundárnou protilátkou konjugovanou s FITC (fluorescein isothiocyanate), (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Pre zhotovenie preparátov bolo použité montovacie médium Vectashield s propidium iodidom pre vizualizáciu bunkových jadier (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA). Všetky experimenty boli prevedené dvakrát.

Rezy boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom Olympus BX 51 pri zväčšení 100–400-krát. Pre fotografickú dokumentáciu sme použili Vosskuhler VDS CCD – 1300 kameru (VDS Vosskuhler GmbH, Nemecko) a pre hodnotenie vzorkov program LUCIA 4.8 (Laboratory Imaging, ČR). Intenzita signálu bola hodnotená jednou osobou pomocou škály: – negatívita, + slabá pozitívita, ++ stredná pozitívita, +++ silná pozitívita.

## VÝSLEDKY

Intenzita signálu pre jednotlivé reťazce kolagénu IV a ich lokalizácia v kontrolných rohovkách a rohovkách pacientov so ZPD je zobrazená v tabuľke 2.

Reťazec  $\alpha 1$  kolagénu IV nebol detekovaný ani v BME, ani v strome kontrolných rohoviek. Pozitívny signál bol zaznamenaný v BM limbusu a spojovky (dáta neuvedené). V jednom prípade bol reťazec  $\alpha 1$  detekovaný na stromálnej strane DM v jednej línii na periférii rohovky (K3).

BME pacientov so ZPD bola negatívna. Stroma troch pacientov bola silno pozitívna predovšetkým v zadnej časti (1/5 – 1/3 stromy). Prechod medzi silno pozitívnou a kompletne negatívnou časťou stromy bol veľmi výrazný. U šiestich pacientov so ZPD bol reťazec  $\alpha 1$  slabo až silno pozitívny na endotelovej strane DM v jednej línii na periférii rohovky (P1, P2) alebo prerušovane po celej dĺžke DM (P3, P4). U pacientov P5 a P7 bola táto línii zdvojená (obr. 1A).

**Tab. 2. Prítomnosť reťazcov Š kolagénu IV v bazálnej membráne epitelu (BME), v strome (S) a v Descemetovej membráne (DM) zdravých rohoviek (K) a rohoviek pacientov so ZPD (P)**

Vzorky	Š1			Š2			Š3			Š4			Š5			Š6		
	Kontroly	BME	S	DM	BME	S	DM	BME	S	DM	BME	S	DM	BME	S	DM	BME	S
K1	-	-	-	-	-	++	+	+	+	-	-	+++	+++	+	++	++	-	+++
K2	-	-	-	-	-	-	++	+	+	-	-	++	+++	+	+++	+++	-	+++
K3	-	-	++	-	-	++	-	+	+	-	-	+	++	+	++	+++	-	++
K4	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	+	+++	-	++	++	-	++
K5	-	-	-	-	-	+	++	+	+	-	-	++	+++	+	+++	+++	-	++
K6	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	++	+++	-	++	++	-	+
K7	-	-	-	-	-	+	-	+	++	-	-	++	+++	+	+++	++	-	+++
ZPD																		
P1	-	-	++	-	-	++	+++	++	+++	-	-	+	+++	+	++	+++	-	+
P2	-	-	+++	+	-	+++	-	++	+	-	-	+	+++	-	+++	+	-	++
P3	-	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	++	+++	++	-	++
P4	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	+++	-	+	+	-	+
P5	-	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	-	+	+	+++	+++	+++	++	-	++
P6	-	-	-	-	++	+++	+	+++	+++	-	-	+	+++	+	+++	+	-	+
P7	-	+++	+++	-	++	+++	+	+	+++	-	-	+	++	-	+++	++	-	+

Intenzita signálu: – negativita, + slabá pozitivita, ++ stredná pozitivita, +++ silná pozitivita signálu.

Reťazec  $\alpha 2$  kolagénu IV nebol detekovaný v BME ani v strome kontrolných rohoviek. Pozitívny signál pre reťazec  $\alpha 2$  sa objavil v BM limbusu a spojovky (dáta neuvedené) a v DM šiestich kontrolných rohoviek, a to vo všetkých prípadoch na stromálnej strane (K1, K3 – K7) a v dvoch prípadoch aj na endotelovej strane DM (K1, K4).

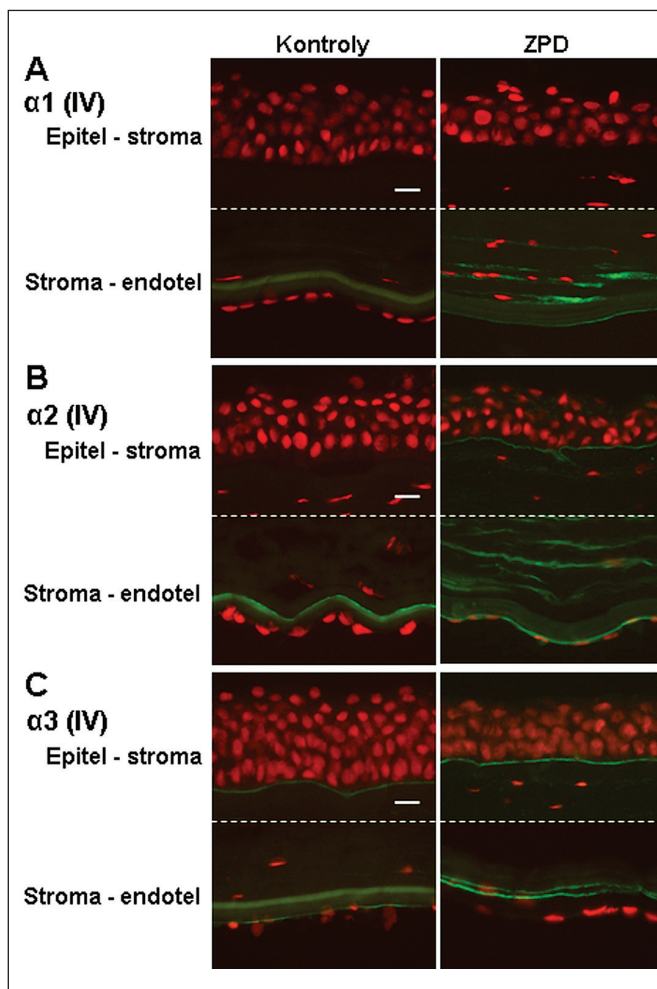
U pacientov so ZPD bola v štyroch rohovkách slabá až silno pozitívna BME. U piatich pacientov bola silno pozitívna zadná (1/10 – 1/3) časť stromy, ktorá bola ostro ohraničená od negatívnej časti stromy. DM všetkých pacientov bola po celej dĺžke pozitívna v jednej línii, u šiestich pacientov na endotelovej strane (P1 – P5, P7), u dvoch pacientov na endotelovej aj stromálnej strane (P3, P5) a u jedného pacienta len na stromálnej strane (P6) (viď obr. 1B).

Reťazec  $\alpha 3$  kolagénu IV bol slabá až stredne pozitívny v BME troch kontrolných rohoviek. Táto pozitivita sa strácala smerom k periférii rohovky. Stroma vykazovala slabú difúznú pozitivitu v piatich a DM vo všetkých kontrolných rohovkách, a to na endotelovej strane v jednej línii po celej dĺžke rohovky.

BME bola slabá až silno pozitívna v šiestich rohovkách od pacientov so ZPD. Stroma štyroch pacientov (P2 – P5) bola silno pozitívna len v zadnej časti (1/5 – 1/3). Stroma troch pa-

**Obr. 1. Výskyt reťazcov  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  kolagénu IV v rohovkách kontrol a pacientov so ZPD.**

**Popis:** Reťazec  $\alpha 1$  (A) bol detekovaný len v zadnej strome a na endotelovej strane Descemetovej membrány u pacientov so ZPD. Reťazec  $\alpha 2$  (B) bol u pacientov so ZPD prítomný v bazálnej membráne epitelu, v zadnej časti stromy a na endotelovej strane Descemetovej membrány. Výskyt reťazca  $\alpha 3$  (C) sa príliš nelíšil medzi kontrolnou a patologickou rohovkou (pozitivita v bazálnej membráne epitelu, na endotelovej strane Descemetovej membrány; u pacienta so ZPD zdvojená línia). Signál pre všetky reťazce  $\alpha$  je zelený (FITC – Fluorescein isothiocyanate) a jadrá sú zviditeľnené propidium jodidom (PI). Mierka znázorňuje 10  $\mu\text{m}$





cientov (P1, P6 a P7) vykazovala slabú až silnú difúznú pozitívu po celej dĺžke stromy. DM bola slabo až silno pozitívna u šiestich pacientov v jednej línii po celej dĺžke endotelu. U pacienta P3 bola táto lúnia zdvojená (obr. 1C).

Reťazec  $\alpha 4$  kolagénu IV nebol detekovaný v BME ani v strome kontrolných rohoviek. DM všetkých kontrolných rohoviek vykazovala slabú až silnú pozitívu na endotelovej strane po celej dĺžke rohovky.

Reťazec  $\alpha 4$  nebol prítomný ani v BME, ani v strome rohoviek získaných od pacientov so ZPD (okrem slabo pozitívnej zadnej 1/3 stromy pacienta P5). Na endotelovej strane DM piatich rohoviek bol detekovaný slabý signál pre reťazec  $\alpha 4$ . V dvoch rohovkách signál nebol prítomný.

Reťazec  $\alpha 5$  kolagénu IV vykazoval silnú pozitívu v BME a strednú až silnú pozitívu na endotelovej strane DM kontrol. Stroma piatich kontrolných rohoviek vykazovala slabú difúznú pozitívu po celej dĺžke stromy.

Stredne až silno pozitívny signál bol prítomný aj v BME a na endotelovej strane DM patologických rohoviek. U pacientov P3 a P5 sa objavilo zdvojenie lúnie v DM. Stroma pacientov P3 a P5 bola silno pozitívna len v zadnej časti (1/5 – 1/3), stroma pacientov P1 a P6 vykazovala slabú difúznú pozitívu po celej dĺžke a stroma ostatných pacientov bola negatívna.

Reťazec  $\alpha 6$  kolagénu IV bol stredne až silno exprimovaný v BME kontrolných rohoviek. Pozitívna bola aj BM limbusu, spojovka bola negatívna (dáta neuvedené). Stroma všetkých kontrolných rohoviek bola negatívna. DM vykazovala slabú až silnú pozitívu na endotelovej strane v jednej línii po celej dĺžke rohovky.

BME a DM väčšiny rohoviek pacientov so ZPD boli slabo až stredne pozitívne, stroma bola negatívna.

V bunkách endotelu a epitelu nebol prítomný žiaden z detekovaných reťazcov kolagénu IV.

---

## DISKUSIA

---

Cieľom tejto štúdie bolo charakterizovať výskyt reťazcov  $\alpha 1$  –  $\alpha 6$  kolagénu IV v kontrolných rohovkách a rohovkách pacientov so ZPD. Charakterizácia lokalizácie jednotlivých reťazcov kolagénu IV v normálnej rohovke je dôležitá ako pre poznanie štruktúry zdravej rohovky, tak aj pre zistenie prípadných rozdielov v prítomnosti a lokalizácii kolagénu v patologických rohovkách.

Výskyt jednotlivých reťazcov  $\alpha$  kolagénu IV v našich kontrolných rohovkách je takmer zhodný so zverejnenými výsledkami lokalizácie kolagénu IV [19, 26]. Na rozdiel od nás detekovali Ljubimov a kol. [19] reťazec  $\alpha 1$  na stromálnej strane DM a reťazec  $\alpha 4$  v BME a strome. Naopak Tuori a kol. [26] podobne ako my reťazec  $\alpha 4$  v BME nedetekovali. Rozličné výsledky môžu byť spôsobené hlavne použitím odlišných protilátok a modifikáciami v prevedení imunohistochemickej metódy.

Za zásadný nález považujeme oproti kontrolám značne zvýšený výskyt reťazca  $\alpha 1$  v DM väčšiny rohoviek pacientov so ZPD. Prítomnosť reťazca  $\alpha 1$  kolagénu IV bola zaznamenaná aj v zadnej strome troch pacientov so ZPD. Reťazec  $\alpha 2$  sme oproti negatívnej strome všetkých kontrolných rohoviek detekovali v strome väčšiny rohoviek pacientov so ZPD. Oproti kontrolám sme zaznamenali aj zosilnenie intenzity signálu reťazca  $\alpha 2$  aj v DM a BME. Lokalizácia reťazcov  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  bola na rozdiel od kontrolných rohoviek (pozitívna na stromálnej strane DM) zaznamenaná na endotelovej strane DM, ktorá sa tvorí v dospelosti a môže vypovedať o zmenách vznikajúcich na základe abnormálnej sekrécie patologického endotelu.

Keďže reťazce  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  sa u kontrol exprimujú predovšetkým v BM limbusu a spojovky, v oblastiach s vysokou prolifer

račnou činnosťou, domnievame sa, že ich zvýšený výskyt na endotelovej strane DM u pacientov so ZPD môže byť spojený s proliferáčnou kapacitou patologického endotelu, v ktorom sa nachádzajú bunky exprimujúce proliferáčny marker Ki67 (dáta neuvedené). Navyše promigračné vlastnosti reťazcov  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  boli už popísané [23]. Bolo preukázané, že zmeny v zložení BM môžu navodiť zmeny v expresii cytokeratínov v bunkách ležiacich na BM [14]. Môžeme si predstaviť, že zmeny v zložení DM vedú k zmenám fenotypu endotelových buniek (epitelizácii endotelu), k jeho patologickej sekrécii, a tým spätne k ďalším zmenám v štruktúre DM.

Akumulácia reťazcov  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  a strata reťazcov  $\alpha 3$  a  $\alpha 5$  kolagénu IV bola popísaná aj v BME rohoviek pacientov s keratokonusom [5, 11, 26]. K strate reťazcov  $\alpha 3$  a  $\alpha 5$  ani k akumulácii reťazca  $\alpha 1$  u nášho pacienta so ZPD a s keratokonusom (P5) nedošlo. U tohto pacienta sme v BME detekovali reťazec  $\alpha 2$ , ten sa ale vyskytoval aj v BME troch ďalších pacientov so ZPD (P2 – P4) bez prítomnosti keratokonusu. Z toho dôvodu akumuláciu reťazca  $\alpha 2$  v BME nemôžeme jednoznačne dávať do súvislosti s prítomnosťou keratokonusu. To, či dochádza k akumulácii reťazca  $\alpha 2$  v BME niektorých pacientov so ZPD v dôsledku ZPD, je treba overiť na väčšom súbore kontrolných aj patologických rohoviek.

Vyššiu intenzitu signálu pre reťazec  $\alpha 3$  kolagénu IV v rohovkách získaných od pacientov so ZPD sme oproti kontrolám detekovali na úrovni BME, stromy a DM. Výskyt reťazca  $\alpha 3$  v endoteli rohovky jedného pacienta so ZPD v dôsledku mutácie génu TCF8 bol popísaný Krafchakom [12]. V našich experimentoch sme prítomnosť žiadneho zo sledovaných reťazcov kolagénu IV v endoteli pacientov nepreukázali, aj napriek tomu, že mutácia v ZEB1 géne bola preukázaná u jedného nášho pacienta (P3), [18]. Zaujímavé je, že aj pacienti bez detekovanej mutácie v tomto géne vykazujú podobné zmeny v zastúpení a lokalizácii jednotlivých reťazcov kolagénu IV.

Táto štúdia charakterizuje výskyt jednotlivých reťazcov kolagénu IV v rohovkách pacientov so ZPD. U ZPD dochádza k akumulácii reťazcov  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  predovšetkým v DM a rohovkovej strome. Zmeny v zložení a lokalizácii reťazcov kolagénu IV spolu s intracelulárnymi zmenami patologického endotelu môžu byť podkladom morfológických zmien aj proliferáčnej kapacity, ku ktorým dochádza (zatiaľ bez preukázateľnej korelácie ku zmenám na molekulárne-genetickej úrovni) v rohovkách pacientov so ZPD.

---

## ZÁVER

---

Reťazce kolagénu IV v zdravej rohovke vykazujú značnú heterogenitu v lokalizácii v jednotlivých vrstvách rohovky.

Z našich výsledkov vyplýva, že u pacientov so ZPD dochádza k zmenám v zastúpení a lokalizácii jednotlivých reťazcov kolagénu IV na úrovni DM, stromy ale aj BME. K akumulácii dochádza u reťazca  $\alpha 1$  v DM a strome a u reťazca  $\alpha 2$  v DM, strome aj BME. Mechanizmus vzniku týchto zmien, ktoré môžu podporovať proliferáčnú kapacitu a morfológické zmeny patologického endotelu na molekulárne genetickej príčine zatiaľ nebol zistený.

## Podakovanie

Táto práca bola podporovaná z výskumného zámeru Ministerstva školstva, mládeže a športu MSM 0021620806/20610011. Autori ďakujú Dr. Sadovi za poskytnutie protilátok proti reťazcom  $\alpha 4$  a  $\alpha 6$  kolagénu IV, MUDr. Viere Veselej a Šárke Kalašovej za pomoc pri technickej príprave experimentov.

## LITERATÚRA

1. **Biswas, S., Munier, F.L., Yardley, J., et al.:** Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the  $\alpha 2$  chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum. Mol. Genetics*, 21, 2001: 2415–2423.
2. **Boruchoff, S.A., Kuwabara, T.:** Electron microscopy of Posterior polymorphous degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 72, 1971: 879–887.
3. **Cibis, G.W., Krachmer, J.H., Phelps, C.D., et al.:** Iridocorneal adhesion in Posterior polymorphous corneal dystrophy. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, 81, 1976: 770–777.
4. **Cibis, G.W., Krachmer, J.H., Phelps, C.D., et al.:** The clinical spectrum of Posterior polymorphous dystrophy. *Arch. Ophthalmol.*, 95, 1977: 1529–1537.
5. **Deng, Y., Liu, S., Cai, R.:** Immunohistochemistry research on keratoconus. *Yan Ke Xue Bao*, 17, 2001: 65–67, 75.
6. **Gwilliam, R., Liskova, P., Filipec, M., et al.:** Micro heterogeneity in Czech families with Posterior polymorphous corneal dystrophy mapping to chromosome 20p11.2 and the exclusion of the candidate gene VSX1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 2005: 4480–4484.
7. **Hogan, M.J., Bietti, G.:** Hereditary deep dystrophy of the cornea (Polymorphous). *Am. J. Ophthalmol.*, 68, 1969: 777–788.
8. **Hudson, B.G., Reeders, S.T., Tryggvason, K.:** Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport Syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.*, 268, 1993: 26033–26036.
9. **Jirsova, K., Merjava, S., Martincova, R., et al.:** Immunohistochemical characterization of cytokeratins in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients. *Exp. Eye Res.*, 84, 2007: 680–686.
10. **Kefalides, N.A.:** Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, 6, 1973: 63–104.
11. **Kenney, M.C., Nesburn, A.B., Burgeson, R.E., et al.:** Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas. *Cornea*, 16, 1997: 345–351.
12. **Krafchak, C.M., Pawar, H., Moroi, S.E., et al.:** Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells. *Am. J. Hum. Genet.*, 77, 2005: 694–708.
13. **Krachmer, J.H.:** Posterior polymorphous corneal dystrophy: A disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 83, 1985: 413–475.
14. **Kurpakus, M.A., Stock, E.L., Jones, J.C.:** The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev. Biol.*, 150, 1992: 243–255.
15. **Leinonen, A., Mariyama, M., Mochizuki, T., et al.:** Complete primary structure of the human type IV collagen alpha4(IV) chain. *J. Biol. Chem.*, 269, 1994: 26172–26177.
16. **Lemmink, H.H., Schroder, C.H., Monnens, L.A.H., et al.:** The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum. Mutat.*, 9, 1997: 477–499.
17. **Levy, S.G., McCartney, A. C. E., Sawada, H., et al.:** Descemet's membrane in the Iridocorneal-endothelial syndrome: morphology and composition. *Exp. Eye Res.*, 61, 1995: 323–333.
18. **Liskova, P., Tuft, S.J., Gwilliam, R., et al.:** Novel mutations in the ZEB1 gene identified in Czech and British patients with posterior polymorphous corneal dystrophy. *Hum. Mutat.*, 28, 2007: 638.
19. **Ljubimov, A.V., Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., et al.:** Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab. Invest.*, 72, 1995: 461–473.
20. **Marshall, G.E., Konstas, A.G., Lee, W.R.:** Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 229, 1991: 157–163.
21. **Michelacci, Y.M.:** Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36, 2003: 1037–1046.
22. **Nishida, T.:** Cornea. In: Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E.J. (eds.): *Cornea* (2nd edition). Elsevier MOSBY Inc., 2005, 3–26.
23. **Ortega, N., Werb, Z.:** New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.*, 22, 2002: 4201–4214.
24. **Prockop, D.J., Kivirikko, K.I.:** Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 1995: 403–434.
25. **Rodrigues, M.M., Sun, T.T., Krachmer, J.H., et al.:** Epithelialization of the corneal endothelium in Posterior polymorphous dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 19, 1980: 832–835.
26. **Tuori, A.J., Virtanen, I., Aine, E., et al.:** The immunohistochemical composition of corneal basement membrane in keratoconus. *Curr. Eye Res.*, 16, 1997: 792–801.
27. **Waring, G.O.:** Posterior collagenous layer of the cornea: ultrastructural classification of abnormal collagenous tissue posterior to Descemet's membrane in 30 cases. *Arch. Ophthalmol.*, 100, 1982: 122–134.

*Mgr. Stanislava Merjava  
Laboratoř biologie a patologie oka,  
Institut dědičných metabolických chorob  
VFN a 1. LF Univerzity Karlovy  
U Nemocnice 2  
128 08 Praha  
merjava@centrum.cz*